

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA MANCHA BRANCA (WSV) EM *Litopenaeus*
vannamei POR MÉTODOS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO: HIBRIDIZAÇÃO
IN SITU E PCR EM TEMPO REAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Risoleta Freire Marques

TALITA MEDEIROS DE SOUZA

FLORIANÓPOLIS
2008

Souza, Talita Medeiros de,

Detecção do vírus da mancha branca (wsv) em *Litopenaeus vannamei* por métodos de diagnóstico moleculares: Hibridização *in situ* e PCR em Tempo Real / Talita Medeiros de Souza. – 2008.

46 f.: figs., tabs.

Orientadora: Maria Risoleta Freire Marques.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

1. *Litopenaeus vannamei*; 2. Vírus da mancha branca; 3. Diagnóstico; 4. Hibridização *in situ*.

**Detecção do vírus da mancha branca (wsv) em *Litopenaeus vannamei*
por métodos de diagnóstico moleculares: Hibridização in situ e PCR
em Tempo Real.**

Por

TALITA MEDEIROS DE SOUZA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Maria Risoleta Freire Marques - *Orientadora*

Dr. Eduardo Cargnin Ferreira

Dr. Luís Alberto Romano

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Maria Risoleta Freire Marques, por ter me recebido tão bem no laboratório, por toda a confiança em mim depositada e pelos conhecimentos transmitidos. Obrigada também pelo seu carinho e paciência.

À Me. Isabel Cristina (Bel) pelos inúmeros ensinamentos, dicas e ajudas durante todo o trabalho. Obrigada por toda a paciência, pelas orientações, gargalhadas e desabafos. Seria complicado sem você....

À Ana e à Me. Juliana (Ju), que assim como a Bel, me ajudaram muito, ensinando toda a parte de extração de DNA e PCR, tirando várias dúvidas, dando vários conselhos e dicas. São pessoas que servem de exemplo pela sua força de vontade e organização. Obrigada!

A toda a equipe do LABICAI, pelos ótimos momentos, gargalhadas, ensinamentos, companheirismo e paciência. Valeu galera e desculpa qualquer coisa!

À professora Dra. Aimê Rachel Magalhães por ter concedido o espaço físico para a realização do embocamento das amostras e a realização dos primeiros testes histológicos, e por ter aceitado participar da banca.

À professora Dra. Zenilda Laurita Bouzon, por tão gentilmente ter cedido seu micrótomo para a realização dos cortes histológicos, bem como aos seus alunos, sempre atenciosos e dispostos a me ajudar.

Ao professor Dr. José Marino Neto por ceder seu microscópio com sistema de captação de imagens.

Ao professor Dr. Eduardo Carginin Ferreira e ao professor Dr. Luis Alberto Romano por terem aceitado participar da banca.

Aos professores Drs. Boris Ugarte Stambuk e Hernán Terenzi por terem cedido alguns reagentes para a realização da técnica de Hibridização *in situ*.

Ao Carlito, um exemplo para todos os servidores públicos, eficiência em pessoa! Em oito anos de UFSC, nunca vi um funcionário assim. Obrigada pela disposição, por sempre me atender pacientemente, por esclarecer as minhas dúvidas e me acalmar nos momentos de desespero.

À FAPESC – Fundação de Apoio à pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina, pelo financiamento que viabilizou este estudo (Contrato nº 12.284/07-0), à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos concedida, e à SEAP - Secretaria Especial de Agricultura e Pesca, que através do Processo 352/06 proporcionou a compra do aparelho de PCR em Tempo Real.

Ao professor Dr. Afonso Celso Dias Bainy pela ajuda financeira, concedida através da bolsa de apoio técnico do CNPq.

Aos Professores da Pós-Graduação em Aqüicultura, pelo conhecimento/experiência transmitidos nas aulas e aos colegas do mestrado, em especial Andrezza, Maurício, Neiva, Cíntia, Rafinha, Fabrício e Kenzo.

Aos meus pais, por todo o apoio dado para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha formação acadêmica. Muito obrigada por estarem sempre comigo, me orientando sempre que necessário.

Ao Sérgio, que apesar das distâncias durante esses três anos, esteve sempre presente, seja ao vivo ou via internet. Obrigada por todo o amor, amizade, dedicação, orientação e acima de tudo, paciência. Meu psicólogo e orientador de plantão!

LISTA DE ABREVIATURAS

CTAB – brometo de cetil-trimetilamônio

dNTP – desoxirribonucleotídio trifosfatado

fg - fentograma

IMNV – Infectious Myonecrosis Virus

M – molar

mM - milimolar

ng – nanograma

pb – pares de bases

pg – picograma

SDS – sódio Dodecil Sulfato

SLS – sódio Lauril Sulfato

SSC – tampão citrato de sódio

Taq – *Thermus aquaticus*

TE – tampão Tris/EDTA

WSSV – White Spot Syndrome Virus

μl – microlitro

μm – micrômetro

μM – micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	09
1.1 Breve histórico da carcinicultura.....	09
1.2 O vírus da Mancha Branca.....	10
1.3 Sinais clínicos e desenvolvimento da doença.....	12
1.4 Métodos de diagnóstico da doença.....	14
1.5 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	15
1.6 PCR em Tempo Real.....	16
1.7 Hibridização <i>in situ</i>	16
1.8 Objetivos.....	18
1.8.1 Objetivo Geral.....	18
1.8.2 Objetivos Específicos.....	18
1.9 Revista escolhida para a submissão do artigo científico.....	18
2. CAPÍTULO 1: DETECÇÃO DO VÍRUS DA MANCHA BRANCA (WSV) EM <i>Litopenaeus vannamei</i> POR MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULARES: HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> E PCR EM TEMPO REAL.....	19
Resumo.....	19
2.1 Introdução.....	20
2.2 Materiais e Métodos.....	21
2.2.1 Obtenção e características dos animais.....	21
2.2.2 Extração do DNA genômico.....	21
2.2.3 Gene constitutivo.....	21
2.2.4 PCR <i>nested</i>	22
2.2.5 PCR em Tempo Real.....	22
2.2.6 Marcação não-radioativa da sonda de DNA.....	23
2.2.7 <i>Dot</i> e <i>Slot Blot</i>	23
2.2.8 Hibridização <i>in situ</i>	23
2.3 Resultados.....	24
2.3.1 Integridade do DNA extraído das amostras.....	24
2.3.2 Resultados das PCRs <i>nested</i> para detecção do vírus da Mancha Branca.....	25
2.3.3 Quantificação da carga viral por PCR em Tempo Real.....	26
2.3.4 Comparação entre <i>Dot</i> e <i>Slot Blot</i> , PCR <i>nested</i> e PCR em Tempo Real.....	28
2.3.5 Hibridização <i>in situ</i>	30
2.4 Discussão.....	33
Referências.....	37
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO.....	41

RESUMO

Para contribuir com o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico da Mancha Branca no Brasil, no presente estudo foi padronizada a utilização da hibridização *in situ* (ISH) para a detecção do vírus da mancha branca (WSSV) em camarões *Litopenaeus vannamei*, coletados em fazendas do litoral de Santa Catarina no período de dezembro de 2006 a fevereiro de 2008. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos por outras estratégias de diagnóstico, como a Reação em Cadeia da Polimerase de dois passos (PCR *nested*), PCR em Tempo Real, *Dot* e *Slot Blot* e a análise histopatológica. A PCR em Tempo Real mostrou ser a metodologia mais sensível, sendo capaz de detectar até 3,55 cópias virais/ μ l, enquanto pela PCR *nested* foram detectadas até $3,55 \times 10^5$ cópias virais/ μ l e pela técnica de *blotting* até 2×10^{17} cópias. A ISH foi capaz de detectar o WSSV em animais com carga viral entre média a alta, mas que não apresentavam sinais clínicos da doença. O grau de severidade da infecção refletiu a carga viral quantificada pela PCR em Tempo Real, já que nas amostras com carga viral alta, foi observado um número maior tanto de tecidos atingidos, como de células marcadas, em comparação com as amostras com carga viral moderada. Cada metodologia apresenta vantagens e desvantagens, as quais devem ser avaliadas frente ao perfil e à situação sanitária de um dado estabelecimento. A hibridização *in situ*, associada a outras metodologias, pode contribuir para o diagnóstico mais preciso da doença e auxiliar no monitoramento dos cultivos de forma mais eficiente.

ABSTRACT

Detection of White spot virus (WSV) in *Litopenaeus vannamei* by diagnostic molecular methods: *in situ* hybridization and Real-Time PCR

In order to contribute to the development of diagnostic strategies for the White Spot Syndrome in Brazil, we standardized the *in situ* hybridization (ISH) method for the detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* harvested from farms in the coast side of Santa Catarina, from December 2006 to February 2008. Besides the standardization of this method, the results obtained through ISH were compared to the results obtained through other diagnostic molecular methods - e.g. nested PCR, real-time PCR, dot and slot blot and histopathology analysis. The real-time PCR was the most sensitive one, since it detected as low as 3.55 viral copies/ μ l, while through nested PCR and blotting methods was only possible to detect 3.55×10^5 copies/ml and 2×10^{17} copies/ μ l, respectively. The ISH method was able to detect WSSV in animals with moderate and high viral load but with no clinical signs. Furthermore, there was a good correlation between the results obtained with ISH and the viral load quantified by real-time PCR, since high viral load samples presented a higher number of affected tissues and positive cells than moderate viral load samples. Each methodology has advantages and disadvantages, which must be evaluated according to the farm sanitary profile and situation. The *in situ* hybridization method associated to other methodologies can contribute to a more accurate diagnostic of the White Spot Syndrome and improve the cultivation monitoring.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Breve histórico da carcinicultura

Dentre os setores produtores de alimento, a aqüicultura é, atualmente, o setor que apresenta o maior crescimento (SUBASINGHE, 2005). Segundo a FAO, em 1996 a pesca de captura representou 73% do total da produção pesqueira mundial, enquanto a aqüicultura contribuiu com apenas 27%. Já em 2006, a pesca de captura representou 58% da produção mundial e a aqüicultura 42%. A exploração indiscriminada do estoque pesqueiro natural e a crescente diferença entre a quantidade de pescado capturado e a demanda de consumo, tornaram a aqüicultura uma das alternativas mais viáveis para a produção de alimento de alto valor protéico (CAMARGO; POUHEY, 2005). Entre os diversos segmentos da aqüicultura, o cultivo de camarão – a carcinicultura – vem ganhando cada vez mais destaque. Conforme dados da FAO, em 1997 a produção mundial de crustáceos era de 1.197.097 toneladas, passando a 4.454.974 toneladas em 2006.

A carcinicultura moderna nasceu na década de 30, quando cientistas japoneses iniciaram os trabalhos de larvicultura com *Penaeus japonicus*. No entanto, somente nas décadas de 70 e 80, quando pescadores e larvicultores começaram a abastecer os criadores com grande quantidade de juvenis, a produção de camarões cultivados começou a se desenvolver rapidamente (ROSENBERRY, 1992 apud ANDREATTA; BELTRAME, 2004).

Uma das contribuições de maior importância da carcinicultura brasileira para a sócio-economia de suas zonas de intervenção é a sua capacidade de gerar emprego permanente, beneficiando as populações locais mais carentes do meio rural. Ao longo da cadeia produtiva do camarão cultivado são gerados diversos empregos diretos e indiretos, seja na parte de laboratório, nas fazendas ou, ainda, no processamento (ROCHA, 2003).

A introdução do camarão branco do pacífico, *Litopenaeus vannamei*, no Brasil ocorreu na década de 80, porém somente a partir de 1992 é que os cultivos começaram a se popularizar, após ter sido constatado que os níveis de produtividade obtidos com essa espécie eram sistemática e significativamente superiores aos obtidos com qualquer uma das demais espécies cultivadas até então no país (BORGHETTI; OSTRENSKY; BORGHETTI, 2003). A introdução e a utilização do *L. vannamei* em cultivos comerciais foi realmente um fator revolucionário para a carcinicultura brasileira; de 7.250 toneladas em 1998, a produção de camarões no Brasil passou a 15.000 toneladas em 1999 (crescimento superior a 100%), atingindo 60.128 toneladas em 2002 e 90.180 toneladas em 2003 (ROCHA, 2002, 2007; BORGHETTI; OSTRENSKY; BORGHETTI, 2003). Porém, em 2004 a produção caiu para 76.000 toneladas e de 2005 até 2007 manteve-se em torno de 65.000 toneladas por ano (ROCHA, 2007). Essa queda na produção de camarões entre 2004 e 2007 ocorreu principalmente devido à incidência de enfermidades que afetaram os cultivos.

Em Santa Catarina a introdução da espécie *L. vannamei* ocorreu no ano de 1998, e os excelentes resultados obtidos motivaram a elaboração do Programa Estadual de Cultivo de Camarões Marinhos, lançado no município de Laguna, em maio de 1999 (COSTA; ANDREATTA; GRUMANN, 1999).

O grande potencial reprodutivo, a curta duração dos cultivos e os altos preços do produto no mercado mundial constituem aspectos positivos para o investimento na criação de peneídeos. Porém, essa atividade tem se caracterizado como negócio de alto risco, mesmo com os índices positivos registrados.

O surgimento de enfermidades no Equador, na China e Taiwan teve conseqüências catastróficas, e as diversas viroses continuam gerando perdas econômicas. Além disso, o desenvolvimento do cultivo de camarões promoveu a destruição de grandes áreas de manguezais, salinização de áreas de agricultura e a poluição orgânica de estuários. Foi necessário reduzir as áreas de cultivo, limitar a densidade dos animais nos viveiros e, em muitos casos, abandonar a atividade (ANDREATTA; BELTRAME, 2004).

Em Santa Catarina, a safra de camarões 2004/2005 prometia bater recordes de produção, produtividade, geração de empregos e receita. Incentivado pelo apoio do governo estadual, o setor especializava-se constantemente, deixando otimistas produtores, técnicos e as comunidades adjacentes às fazendas. No entanto, em novembro de 2004 começaram a ocorrer as primeiras mortalidades, no sul do estado, na região do Complexo Lagunar, em fazendas da região da Pescaria Brava (Laguna) e Imaruí. Amostras coletadas na região e enviadas para diagnóstico realizado na Universidade do Arizona (UAZ), onde se encontra um dos laboratórios de referência da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), foram diagnosticadas como sendo positivas para o vírus da síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus - WSSV*) em 11 de janeiro de 2005. A presença do vírus foi confirmada pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, sendo o diagnóstico realizado em amostras recebidas em 15 de janeiro de 2005. As fazendas contaminadas foram cloradas e o repovoamento foi suspenso até setembro de 2005, promovendo-se o vazio sanitário.

A ocorrência do WSSV provocou a diminuição súbita das atividades, gerando grandes prejuízos para a carcinicultura catarinense. Na safra 2006/2007, apenas três fazendas da região Sul obtiverem sucesso na produção de camarões, uma delas, inclusive, vitimada anteriormente pela Mancha Branca, mostrou sinais de recuperação, com ótimos resultados técnicos. No entanto, a produção da Região Sul ainda encontra-se bastante comprometida (MELLO; FARIAS, 2007).

1.2 O vírus da Mancha Branca

Os animais em sistemas de cultivo apresentam maior contato entre si, restrição de movimento, estando sujeitos muitas vezes à baixa qualidade da água, mudanças repentinas na salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido, manipulação e transporte; fatores esses que promovem o estresse dos animais, podendo favorecer a ação dos agentes patogênicos (MISCIATTELLI; JONES; LATCHFORD, 1999). As fazendas e os viveiros são susceptíveis à invasão de protozoários, fungos e bactérias, mas as enfermidades causadas por vírus são as que provocam atualmente as maiores perdas e prejuízos para o setor (PÁEZ-OSUNA, 2001).

Entre os múltiplos problemas virais descritos para camarões, o vírus da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus - WSSV*) é o mais devastador e o mais difundido (WANG, Q. et al., 1999; TAPAY; NADALA; LOH, 1999). Desde 1992, a doença tem causado mortalidade na Ásia. Em 1995 o

vírus foi detectado nos Estados Unidos, e em 1999, na América Central e na América do Sul, onde causou consideráveis perdas sócio-econômicas (PÉREZ; VOLCKAERT; CALDERÓN, 2005).

Um resumo cronológico dos relatos de surtos de WSSV em vários países produtores de camarão é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Cronologia dos surtos de WSSV em países produtores de camarão na Ásia e América.

Ano do primeiro relato	País	Referência
1992	Taiwan	Chou et al. 1995
1993	China, Japão, Coréia	Zhan et al. 1998; Inouye et al. 1994; Park et al. 1998
1994	Tailândia, Índia, Bangladesh	Lo et al., 1996a; Karunasagar; Otta; Karunasagar, 1997; Mazid; Banu, 2002
1995	Estados Unidos	Lightner, 1996; Wang, Y.G. et al., 1999
1996	Indonésia, Malásia, Sri Lanka	Durand et al., 1996; Kasornchandra; Boonyaratpalin; Itami, 1998; Rajan et al., 2000
1997	Vietnã	Bondad-Reantaso et al., 2001
1998	Peru	Rosenberry, 2001
1999	Filipinas, Equador, Colômbia, Panamá, Honduras, Nicarágua, Guatemala, Belize	Magbanua et al., 2000; Bondad-Reantaso et al., 2001; Hossain et al., 2001; Wu et al., 2001
1999-2000	México	Bondad-Reantaso et al., 2001
2002	França, Irã	Dieu et al., 2004
2005	Brasil	APHIS-USDA 2005

Fonte: ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008.

Inicialmente, pensou-se que diferentes agentes virais tivessem surgido simultaneamente em diferentes regiões, e a cada um foi dado um nome específico: *Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Baculovirus* (HHNBV) (DURAND et al., 1996), third *Penaeus monodon Non-occluded Baculovirus* (PmNOB III) (WANG et al., 1995; KARUNASAGAR; OTTA; KARUNASAGAR, 1997), *Rodshaped Nuclear Virus of Marsupenaeus japonicus* (RV-PJ) (INOUE et al., 1994; INOUE et al., 1996), *Penaeid Rod-shaped DNA Virus* (VENEGAS et al., 2000), *Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus* (WONGTEERASUPAYA et al., 1995; SAHUL-HAMEED et al., 1998) ou *White Spot Baculovirus* (CHOU et al., 1995; LIGHTNER, 1996). Mais tarde, com base em estudos moleculares, genéticos e filogenéticos, foi reconhecido que um único agente viral era responsável por estes casos. Finalmente, chegou-se a um consenso não-oficial de denominá-lo de *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) - Vírus da Síndrome da Mancha Branca, ou ainda, White Spot Vírus (WSV) – Vírus da Mancha Branca.

As maneiras pelo qual o vírus é disseminado ainda não foram completamente investigadas. Entretanto, estudos têm demonstrado que a rápida dispersão de vírus exóticos pode ser atribuída a insetos aquáticos e aves marinhas, os quais atuam como vetores (GARZA et al., 1997), bem como ao transporte internacional de pós-larvas e adultos infectados (LIGHTNER et al., 1997) e à importação de camarões infectados congelados, para utilização como isca para pesca desportiva, por exemplo (NUNAN; POULOS; LIGHTNER, 1998a). O uso desses camarões infectados tem sido apontado como o principal responsável pela disseminação do vírus da Mancha Branca.

O vírus da mancha branca (WSSV) é um vírus envelopado, baciliforme (CHOU et al., 1995; WANG et al., 1995; WONGTEERASUPAYA et al., 1995), pertencente ao gênero *Whispovirus* e à família *Nimaviridae* (OIE, 2003). O envelope viral é uma estrutura lipídica trilaminar (WONGTEERASUPAYA et al., 1995; DURAND et al., 1997; NADALA; LOH, 1998). Rajendran e colaboradores (1999) investigaram o epitélio estomacal de animais experimentalmente infectados e observaram vírus em arranjos cristalinos ou dispersos pelo núcleo das células (Figura 1).

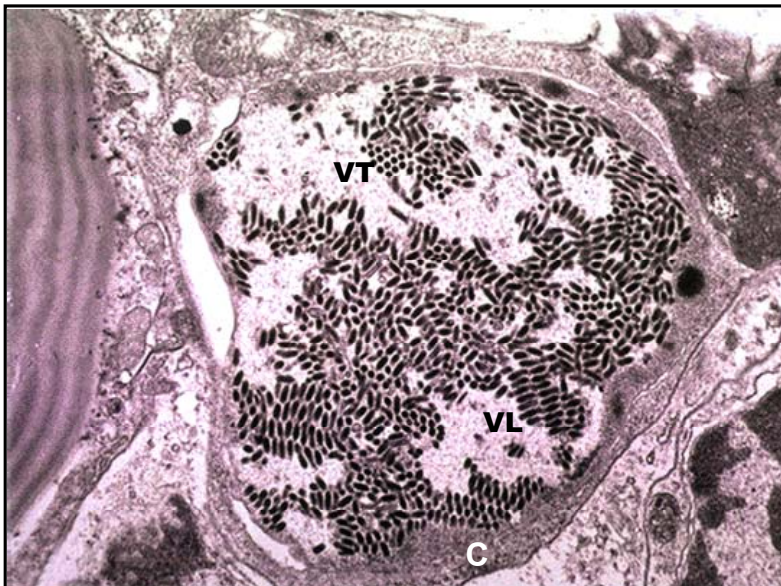


Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão de uma célula de *L. vannamei* infectado com WSSV, mostrando o núcleo da célula repleto de partículas virais em cortes transversais (VT) e longitudinais (VL), e a cromatina comprimida nas margens do núcleo (C). Fonte: WONGTEERASUPAYA et al., 1995.

O nucleocapsídeo está localizado dentro do envelope e apresenta estrutura espiralada composta por subunidades de proteínas globulares (DURAND et al., 1997; NADALA; LOH, 1998). Quando liberado do envelope, o nucleocapsídeo aumenta em comprimento, indicando que ele está comprimido dentro do vírion. O seu material genético é composto por DNA de dupla fita, sendo encontradas várias linhagens de vírus, que são extremamente virulentas e patogênicas para várias espécies de peneídeos e outros crustáceos (DURAND et al., 1997).

1.3 Sinais clínicos e desenvolvimento da doença

É de conhecimento geral de criadores e pesquisadores que várias espécies de camarões peneídeos infectados com WSSV apresentam manchas brancas de 0,5 a 3 mm de diâmetro no exoesqueleto (LO et al., 1996b; WU et al., 2001) (Figura 2). Porém, o mecanismo exato da formação das manchas ainda não é conhecido. É possível que a infecção por WSSV provoque disfunção do

epitélio subcuticular do animal, resultando no acúmulo de sais de cálcio na cutícula (WANG, Y.G. et al., 1999).

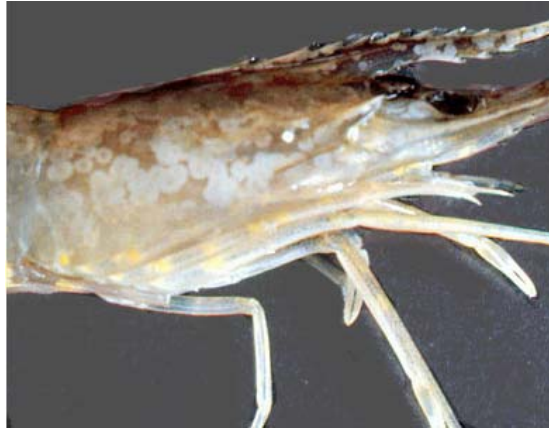


Figura 2: Presença de manchas brancas na carapaça de um indivíduo de *L. vannamei* infectado com o WSSV. Fonte: LIGHTNER, 1996.

Outros sinais clínicos da doença incluem coloração avermelhada do corpo e apêndices (LIGHTNER et al., 1998), anorexia (CHOU et al., 1995; DURAND et al., 1996; FLEGEL, 1997), letargia (WONGTEERASUPAYA et al., 1995; DURAND et al., 1997), fácil desprendimento da cutícula (LO, et al., 1996b), dilatação e coloração amarelada do hepatopâncreas (SAHUL-HAMEED et al., 1998), diminuição da quantidade e problemas de coagulação da hemolinfa (WANG, Q. et al., 2000a; KIATPATHOMCHAI et al., 2001).

Quando infectados, os camarões cultivados nadam de forma irregular próximo às bordas dos viveiros, apresentando os sinais clínicos um ou dois dias antes do surgimento da primeira mortalidade (KOU et al., 1998). A mortalidade em massa pode ocorrer dentro de até dez dias após o início da manifestação da doença (KARUNASAGAR; OTTA; KARUNASAGAR, 1997; LOTZ; SOTO, 2002). Nos tanques de engorda, os camarões juvenis de todas as idades e tamanhos são susceptíveis à doença, mas a mortalidade em massa normalmente ocorre um ou dois meses depois do povoamento (KASORNCHANDRA; BOONYARATPALIN; ITAMI, 1998).

A infecção por WSSV nos tecidos é caracterizada pela hipertrofia do núcleo, surgimento de inclusões intranucleares e marginalização da cromatina (DURAND et al., 1997; WANG, Q. et al., 2000a) (Figura 3).

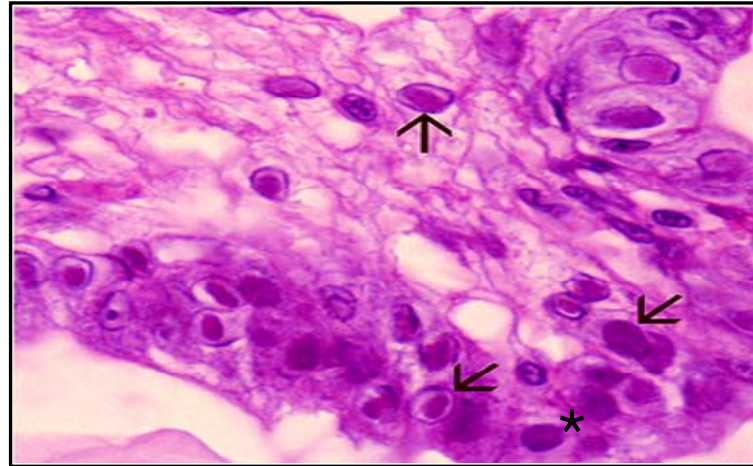


Figura 3: Corte histológico de estômago de *Penaeus chinensis* infectado com WSSV. As inclusões intranucleares são abundantes e apresentam-se em diferentes fases de desenvolvimento. Os corpos de inclusão em fase inicial (setas), que predominam neste corte, são centronucleares, eosinófilos e separados da membrana nuclear e da cromatina marginalizada por um halo proveniente de artefato. ★) Corpos de inclusão em estágio final. Coloração Mayer-Bennett H&E. Aumento 900X. Fonte: LIGHTNER, 1996.

Estas inclusões intranucleares são distintas e maiores que as inclusões tipo Cowdry A, características do vírus da necrose hipodermal e hematopoiética infecciosa (IHHNV) (WONGTEERASUPAYA et al., 1995). O núcleo infectado torna-se progressivamente maior e mais basofílico (CHANG et al., 1996; DURAND et al., 1996, 1997; LO et al., 1996b; FLEGEL, 1997; WANG, et al., 1998; OTTA et al., 1999; TAKAHASHI et al., 2000). Nos últimos estágios da infecção pode ocorrer cariorrexis (desintegração da membrana nuclear) e desintegração celular, levando à formação de áreas necrosadas no tecido (KARUNASAGAR; OTTA; KARUNASAGAR, 1997; KASORNCHANDRA; BOONYARATPALIN; ITAMI, 1998; WANG, Y.G. et al., 1999).

Wang, Y.G. e colaboradores (1999) relataram que o vírus infecta brânquias, órgão linfóide, tecido hematopoiético, intestino anterior, estômago, epiderme cuticular, tecido conjuntivo, coração, hemócitos, glândula antenal, tecido nervoso e o ovário. Porém, não se observaram células afetadas no hepatopâncreas ou no intestino médio, mesmo em animais moribundos. Além disso, as observações histopatológicas revelaram que as mudanças causadas pela infecção viral são similares em todos os tecidos-alvo.

1.4 Métodos de diagnóstico da doença

Além da visualização de manchas brancas no exoesqueleto dos animais infectados, é observada também letargia, anorexia e natação irregular pelas bordas do tanque (PÉREZ; VOLCKAERT; CALDERÓN, 2005). No entanto, a ausência dos sinais acima mencionados não exclui a possibilidade de o camarão estar infectado, uma vez que os animais podem ser assintomáticos. Assim, torna-se necessária a confirmação laboratorial através de métodos mais sensíveis e acurados.

Muitos estudos vêm sendo realizados e muitas técnicas de diagnóstico desenvolvidas com o intuito de compreender, prevenir e controlar, não só a síndrome da mancha branca, como outras viroses que infectam camarões (WANG, C.H., 2000; BACHÈRE, 2000; PÉREZ; VOLCKAERT; CALDERÓN, 2005; ROUT, 2005; WANG; ZHAN, 2006).

Os métodos de detecção utilizados para o diagnóstico de WSSV incluem a identificação macroscópica de pontos cuticulares brancos, observações histológicas (microscopia de luz e eletrônica), hibridização *in situ* e *dot blot*, através de sondas específicas para o WSSV, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), PCR em Tempo Real, testes imunocromatográficos e bioensaio (OIE, 2003).

Nos primeiros trabalhos que relatam a detecção do WSSV com sucesso, por técnicas de biologia molecular, foi empregada a técnica de amplificação por PCR, utilizando diferentes conjuntos de iniciadores (LO et al., 1996b; WONGTEERASUPAYA et al., 1996; KIM et al., 1998).

Sondas de DNA marcadas não-radioativamente por Digoxigenina (DIG) têm sido usadas para análise por *Dot blot* de vários vírus de camarão, como o *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) (LU et al., 1993), vírus da necrose hipodermal e hematopoiética (IHHNV) (NUNAN; POULOS; LIGHTNER, 2000) e, mais recentemente para o WSSV (SHEKHAR; AZAD; RAVICHANDRAN, 2006). Sondas marcadas não-radioativamente foram também empregadas na hibridização *in situ* para a detecção do vírus Taura (TSV) (NUNAN; POULOS; LIGHTNER, 1998b) e do WSSV (NUNAN; LIGHTNER, 1997; DURAND et al., 1996; CHAPMAN et al., 2004), além de *Southern blot* para o WSSV (WANG, Q. et al., 2000b).

1.5 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Em 1987, Mullis e Faloona descreveram um método revolucionário por eles desenvolvido – a Reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando uma DNA Polimerase termoestável, capaz de ser executada inteiramente *in vitro*, sem o uso de células. Empregando esta técnica, uma determinada seqüência de nucleotídeos pode ser seletiva e rapidamente replicada em grandes quantidades a partir de qualquer DNA que a contenha.

A PCR é baseada no uso da DNA-polimerase para copiar um molde de DNA em ciclos repetidos de replicação. Cada ciclo envolve três passos: denaturação, anelamento e extensão (DEGEN et al., 2006). Pequenos oligonucleotídeos iniciadores, que são hibridizados ao DNA-molde no início e no final da seqüência de DNA alvo, guiam a polimerase para a seqüência a ser copiada. Guiada por estes iniciadores a DNA-polimerase é, então, usada para produzir bilhões de cópias da seqüência requerida, que poderá, após o processo, ser visualizada por coloração após a separação pela eletroforese em gel (ALBERTS et al., 1999).

Existem três aplicações especialmente úteis para a PCR. Ela pode ser usada para (1) clonar diretamente um determinado fragmento de DNA de uma célula. O molde original para a reação de PCR pode ser o DNA ou o RNA, de modo que tanto uma cópia de DNA genômico como um cDNA podem ser obtidos. Além disso, (2) a PCR tem um grande potencial na medicina forense, uma vez que sua sensibilidade extrema torna possível se trabalhar com uma amostra bastante pequena. (3) Outra aplicação é a detecção de infecções virais em estágios bastante precoces. Curtas seqüências complementares do genoma viral são usadas como iniciadores, e seguindo ciclos de amplificação, a presença de uma única cópia viral pode ser determinada (ALBERTS et al., 1999). Na área de patologia de crustáceos, muitos pesquisadores têm feito uso da PCR para estudos acerca de diversos vírus que infectam camarões, caranguejos, siris e outros crustáceos (LO et al, 1996b; KIM et al, 1998;

WANG, C.H. et al., 2000; PHROMJAI et al, 2002; CHAYABURAKUL et al, 2005; NATIVIDAD; NOMURA; MATSUMURA, 2008).

1.6 PCR em Tempo Real

No fim da década de 90, um novo método quantitativo de diagnóstico, a PCR em Tempo Real, passou a ser utilizado para a quantificação de muitos vírus humanos, como por exemplo, hepatite B (CANE et al., 1999) e HIV (LEWIN et al., 1999). Esse método apresenta algumas vantagens em relação à PCR qualitativa, como a rápida análise dos resultados, maior sensibilidade, precisão e reprodutibilidade, facilidade na quantificação, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

O acúmulo dos produtos da PCR é detectado e monitorado diretamente pela leitura do aumento da fluorescência do composto fluorescente utilizado, enquanto na PCR tradicional os produtos precisam ser posteriormente analisados por eletroforese. Cada reação é caracterizada pelo ponto durante a ciclagem onde a amplificação do produto da PCR é detectada pela primeira vez (Ct). A determinação da quantidade de cópias da seqüência alvo em uma determinada amostra é obtida pela medição do seu Ct, e utilizando uma curva padrão, determina-se o número de cópias inicial (DURAND; LIGHTNER, 2002).

Essa poderosa ferramenta de diagnóstico, assim como a PCR convencional, tem sido aplicada à área de virologia de camarões peneídeos, tanto em experimentos com WSSV e IHHNV (TANG; LIGHTNER, 2001; DURAND; LIGHTNER, 2002; DURAND et al., 2003), quanto com os vírus Taura (TSV) e da cabeça amarela (YHV) (MOUILLESSEAU; KLIMPEL; DHAR, 2003).

1.7 Hibridização *in situ*

Ácidos nucleicos, assim como as outras macromoléculas, ocupam posições precisas nas células e tecidos, e uma grande quantidade de informação potencial é perdida quando estas moléculas são extraídas das células. Por esta razão, têm sido desenvolvidas técnicas nas quais sondas de ácidos nucleicos são usadas para localizar seqüências específicas de DNA/RNA, enquanto elas ainda estão no local dentro das células (ALBERTS et al., 1999). Este procedimento, denominado hibridização *in situ* (ISH), permite localizar um gene específico, parte de sua seqüência, seus transcritos ou, ainda, qualquer seqüência específica de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) em tecidos biológicos fixados e processados histologicamente, gerando informações sobre a distribuição dessas moléculas nos diferentes tecidos e tipos celulares de um determinado organismo (SILVA-VALENZUELA et al., 2006).

A ISH, que foi originariamente desenvolvida por Padue e Gall em 1969, tem se tornado uma poderosa ferramenta na área de Patologia, embora continue sendo usada principalmente com fins de pesquisa (EISEL; GRÜNEWALD-JANHO; KRUCHEN, 2002). Existem atualmente diversos processos para a marcação da sonda, podendo-se utilizar, isótopos radioativos, fluorocromos ou antígenos como moléculas marcadoras. No presente estudo foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* com sonda marcada não-radioativamente, tendo como molécula marcadora a Digoxigenina. O método de marcação não radioativa da sonda de DNA com Digoxigenina (DIG) é baseado em um esteróide

isolado das plantas *Digitalis purpurea* e *Digitalis lanata*. Como as flores e as folhas dessas plantas são a única fonte natural de digoxigenina, o anticorpo anti-DIG não se liga a outros materiais biológicos (EISEL; GRÜNEWALD-JANHO; KRUCHEN, 2002).

Nesse método, uma fita complementar de DNA marcada com a molécula digoxigenina (sonda) se liga complementarmente à seqüência alvo do tecido. As duas fitas do DNA são separadas (denaturação), e quando este processo é lentamente revertido, através da redução da temperatura, as fitas complementares se anelam formando os híbridos (fita marcada – seqüência alvo). Então, a molécula ligada à sonda é detectada por um anticorpo conjugado com a enzima fosfatase alcalina, a qual, quando em contato com seu substrato, age sobre o mesmo gerando um precipitado de cor azul arroxeadado, sinalizando a localização da seqüência-alvo (Figura 4).

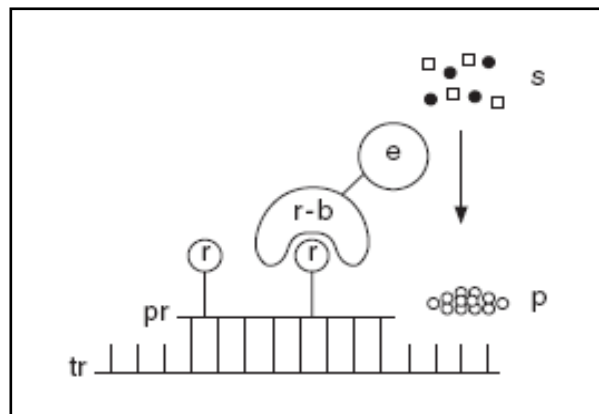


Figura 4: Esquema representando a imunodeteção por reação colorimétrica, da sonda hibridizada com a seqüência alvo. **tr**) seqüência alvo, **pr**) sonda marcada com DIG, **r**) molécula marcadora (DIG), **r-b**) anticorpo contra DIG, **e**) enzima, **s**) substrato, **p**) precipitado colorido. Fonte: AUSUBEL et al., 2003.

Outras técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), permitem a detecção de mRNA ou DNA extraídos de tecidos, mas não permitem observar a distribuição dos transcritos ou DNA em um tipo de população celular ou em áreas de diferentes tecidos. Além disso, a técnica permite relacionar a presença de genes e seus transcritos com os processos patológicos (SILVA-VALENZUELA, 2006).

Cada método de diagnóstico apresenta diferentes vantagens e desvantagens em termos de sensibilidade, especificidade, custos e conveniência. Segundo Chang e colaboradores (1996), a hibridização *in situ* seria mais vantajosa para a detecção do DNA viral que procedimentos como a coloração histológica, a microscopia eletrônica ou a PCR. A detecção do WSSV por coloração histológica, nos últimos estágios de infecção, é relativamente fácil. Entretanto, isso pode ser mais difícil no início da infecção, quando os sinais citopatológicos ainda não são muito óbvios, podendo a ISH superar esse problema (CHANG et al., 1996). Embora a microscopia eletrônica forneça informações sobre os locais de infestação do vírus e o estado de maturação a nível celular, é uma técnica onerosa e demanda muito tempo para a obtenção dos resultados. A hibridização *in situ* pode determinar a localização precisa do vírus no tecido, graças à alta especificidade entre a sonda e a

seqüência alvo do DNA viral, enquanto que a técnica de PCR não fornece informações sobre as células alvo de um dado tecido ou órgão de um camarão infectado.

Para garantir o sucesso e a sustentabilidade do cultivo de camarões, a prevenção e o controle de doenças, é uma estratégia fundamental, devendo ser aliada à implantação de boas práticas de manejo. Neste sentido, pesquisas e estudos sobre os camarões peneídeos, bem como sobre novas metodologias e novos conceitos para a aquicultura de camarões precisam ser realizados e, então, desenvolvidos com e para os produtores (BACHÈRE, 2000). A utilização da técnica de hibridização *in situ* e da PCR em Tempo Real pode contribuir para o monitoramento sistemático e preventivo dos cultivos de maneira mais eficiente, complementando o resultado obtido por outros métodos rotineiros de diagnóstico.

1.8 Objetivos

1.8.1 Geral

Contribuir para a implantação de métodos de diagnóstico da síndrome da mancha branca no Brasil.

1.8.2 Específicos

- Padronizar a técnica de hibridização *in situ* para detecção do vírus da mancha branca no camarão *Litopenaeus vannamei* ;
- Comparar a hibridização *in situ* com outros métodos de diagnóstico: PCR, PCR em Tempo Real, *Slot e Dot Blot* e Histopatologia, para animais com diferentes cargas virais;
- Comparar os métodos de *Blotting*, PCR *nested* e PCR em Tempo Real, utilizados para detecção do WSSV, com relação à sua sensibilidade;
- Verificar possíveis diferenças existentes no grau de infestação dos diferentes órgãos e tecidos analisados.

1.9 Revista(s) escolhida(s) para submissão do(s) Artigo(s) Científico(s)

Parte dos resultados gerados por este estudo já foram apresentados na XXXVII Reunião Anual da SBBq (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular), que ocorreu em maio de 2008, e no X Enbrapoa (Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos), que ocorreu em novembro de 2008.

O trabalho final deverá ser encaminhado para a revista **Journal of Virological Methods** (Qualis A de circulação internacional).

2. CAPÍTULO 1: DETECÇÃO DO VÍRUS DA MANCHA BRANCA (WSV) EM *Litopenaeus vannamei* POR MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULARES: HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* E PCR EM TEMPO REAL

Talita Medeiros de Souza, Isabel Cristina Müller, Maria Risoleta Freire Marques*.

Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 88040-900.

* Autor para correspondência. Tel.: +55 48 3721 6561
E-mail: risomar@mbox1.ufsc.br (M.R.F. Marques)

RESUMO

Dentre os desafios enfrentados pela carcinicultura mundial, o vírus da Mancha Branca (WSSV) representa um empecilho para o crescimento do setor. Este estudo avaliou a técnica de hibridização *in situ* (ISH) para a detecção do WSSV em *Litopenaeus vannamei* coletados em cultivos no litoral sul do Brasil. Além da padronização, os resultados da ISH foram comparados aos obtidos por outras estratégias moleculares de diagnóstico, como a PCR *nested*, PCR em Tempo Real, *blotting* e histopatologia, visando avaliar sua especificidade e sensibilidade. A PCR em Tempo Real mostrou-se a mais sensível, detectando até 3,55 cópias virais/ μ l, enquanto na PCR *nested* e no *Soft Blot* até $3,55 \times 10^5$ cópias/ μ l e até 2×10^{17} cópias/ μ l. foram detectadas, respectivamente. A ISH foi capaz de detectar o WSSV em animais com carga viral média a alta, mas que não apresentavam sinais clínicos da doença. A ISH mostrou ser uma boa ferramenta para a análise qualitativa da infecção, pois houve correspondência entre os seus resultados e a carga viral quantificada pela PCR em Tempo Real: amostras com carga viral alta apresentaram mais células marcadas e tecidos afetados que amostras com carga viral moderada. As vantagens e desvantagens de cada metodologia devem ser consideradas e sua utilização deve contemplar as necessidades e a situação de um dado estabelecimento, bem como os objetivos associados à avaliação do estado sanitário da população alvo.

Palavras-chave: WSSV, *Litopenaeus vannamei*, PCR, PCR em Tempo Real, Hibridização *in situ*

2.1 INTRODUÇÃO

A carcinicultura vem crescendo consideravelmente há mais de três décadas, graças ao desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de camarões de alta qualidade. Porém, desde o seu surgimento em Taiwan no ano de 1992, a Síndrome da mancha branca (WSS) tem sido um grande obstáculo para o completo sucesso desse setor (Lightner e Redman, 1998). O agente causador da doença, conhecido como Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), é um vírus baciliforme, envelopado, que possui como material genético um DNA circular dupla fita (Chou et al. 1995; Wongteerasupaya et al. 1995) e mede entre 250 e 380 nm de comprimento e 70 a 150 nm de largura (Wang et al., 1995). Apesar de ter sido originalmente classificado como pertencente à família *Baculoviridae*, após o sequenciamento do seu genoma e análise filogenética foi verificado que o WSSV e os baculovírus não estão relacionados (van Hulten et al., 2000). Devido à falta de homologia com as famílias de vírus existentes, esse vírus foi classificado em uma nova família, denominada *Nimaviridae*.

Os sinais clínicos da doença incluem o surgimento de pontos brancos no exoesqueleto dos animais, letargia, coloração avermelhada do corpo, principalmente das extremidades, redução no consumo de alimento e natação de maneira irregular próximo às bordas dos viveiros. A mortalidade em massa pode ocorrer dentro de até dez dias após o início da manifestação da doença (Karunasagar et al., 1997; Lotz e Soto, 2002).

Além de infectar diversas espécies de camarão cultiváveis, outros crustáceos são hospedeiros do WSSV, tais como copépodos (Zhang et al., 2007), caranguejos, lagostas (Marques, 2008; Wang, Y.C et al., 1998) e siris (Chang et al., 2001). Estudos recentes relatam ainda a detecção do vírus em amostras de solo dos viveiros de cultivo, mesmo após 10 meses de estocagem (Natividad et al, 2008), e em microalgas como *Chlorella* sp. (Liu et al., 2007). Essa ampla variedade de hospedeiros, somada à sua alta patogenicidade e às características do sistema imunológico dos crustáceos, dificultam o controle da doença (Roch, 1999). Atualmente, na ausência de um tratamento efetivo contra o WSSV, medidas preventivas e o acompanhamento dos cultivos, incluindo diagnósticos precoces e precisos, são estratégias cruciais para o controle da propagação da doença.

Muitos métodos de diagnóstico molecular têm sido desenvolvidos para a detecção do WSSV, pois a análise apenas pelos sinais clínicos não é suficiente, uma vez que esses sinais podem ser resultados de alterações da qualidade da água. Técnicas originalmente utilizadas para o estudo e diagnóstico de doenças humanas, como a PCR, a hibridização *in situ* e, mais recentemente, a PCR em Tempo Real, são empregadas com sucesso na detecção do WSSV. No entanto, como cada técnica apresenta vantagens e desvantagens em termos de sensibilidade, custos e demanda por equipamentos e pessoal treinado, é importante ter conhecimento de qual metodologia mostra-se mais adequada a cada situação. Existem alguns trabalhos comparando a sensibilidade entre os métodos de diagnóstico mais empregados (Durand et al, 2003; Shekhar et al., 2006; Sritunyalucksana et al., 2006). Porém, a grande maioria desses trabalhos faz uso de animais experimentalmente infectados, o que permite um maior controle sobre o experimento e sobre os dados gerados, mas não leva em consideração a interação entre o animal e os vários fatores abióticos, podendo gerar resultados que não reflitam a realidade dos cultivos. Até onde sabemos, não há nenhum trabalho comparando

diversas técnicas de detecção do WSSV em *Litopenaeus vannamei* cultivados. Assim sendo, nesse estudo foram comparadas algumas técnicas de diagnóstico recomendadas pela OIE, como a análise histopatológica, hibridização *in situ*, PCR *nested*, PCR em Tempo Real, *Slot* e *Dot Blot*, levando-se em consideração a sensibilidade de cada método para detectar o WSSV em *L. vannamei* provenientes de fazendas do Sul do Brasil.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Obtenção e características dos animais

Foram utilizados camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, coletados em fazendas do litoral de Santa Catarina; uma fazenda no norte do estado, no município de Araquari, uma localizada em Governador Celso Ramos e três fazendas em Laguna, no sul do estado.

O número de animais coletados por fazenda variou de 8 a 12 exemplares, totalizando 56 animais, os quais tiveram seus pleópodos fixados em etanol 95%, e seus cefalotórax fixados individualmente em fixador de Davidson's AFA para posterior processamento histológico.

Os animais foram coletados aleatoriamente, sendo que nenhum apresentava manchas brancas pelo corpo e em apenas uma das fazendas foi observada uma coloração avermelhada do corpo e apêndices dos animais coletados. Outros sintomas característicos da doença, como anorexia e natação com padrão irregular pelo viveiro, também não foram observados.

2.2.2 Extração do DNA genômico

Foi utilizado o protocolo de Maciel (2002) modificado, no qual o tecido dos pleópodes fixados em álcool 95% foi digerido em solução de lise contendo SDS 1% em TE 1X e proteinase K (1 mg/mL), sendo em seguida, mantido a 65°C por 1 hora e 20 minutos. Uma segunda incubação foi realizada por 1 hora a 55°C, após a adição de NaCl 5M e CTAB 10%. Seguido da incubação, foi acrescentado clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) e as amostras foram centrifugadas a 14 000 rpm por 10 min. Ao sobrenadante, foi adicionado isopropanol e o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em TE 1X. O RNA foi degradado pela ação de RNase (1 mg/ml) e, após a adição de clorofórmio:álcool isoamílico e centrifugação (14 000 rpm), foi adicionado ao sobrenadante acetato de sódio 3M (pH 5,2) e etanol 95%. O DNA precipitado por centrifugação a 2 500 rpm foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 30 µl de TE após a secagem. A integridade das amostras foi avaliada pelo seu perfil eletroforético em gel de agarose 1%. A concentração de DNA (ng) foi determinada em espectrofotômetro (DO₂₆₀), através da relação da absorbância em 260:280 nm.

2.2.3 Gene constitutivo

Para verificar a integridade das amostras e a presença potencial de inibidores enzimáticos na reação de amplificação, parte da seqüência de um gene constitutivo de penéideos, determinada originalmente para *Penaeus monodon*, que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - GAPDH (GenBank, número de acesso [AB191486](#)), foi amplificada de acordo com as condições descritas por Maciel (2002) (Tabela 1). Os iniciadores (primers) descritos por Maciel geram um

amplicon de 298 pb. A análise dos produtos de PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2%.

2.2.4 PCR *nested*

A detecção da seqüência correspondente a parte do genoma do vírus foi realizada segundo protocolo modificado de Lo et al. (1996) (Tabela 1), protocolo recomendado pela OIE (2003), o qual utiliza a PCR *nested*. Nestas condições, a amplificação da seqüência específica do WSSV é realizada em duas etapas, com dois pares de iniciadores distintos, aumentando a sensibilidade do método. Na primeira etapa, o tamanho do fragmento esperado é de 1447pb, enquanto na segunda etapa o fragmento produzido deve conter 941pb. Em ambas as etapas utilizou-se 1µl de *template*, e a análise dos produtos de PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2%.

2.2.5 PCR em Tempo Real

A quantificação da carga viral das amostras foi determinada através de PCR em Tempo Real. Para tanto, foi utilizado o ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mixes (Thermo Scientific) e adicionado à reação um *template* de 100 ng (1 µl) de DNA para um volume final de reação de 20 µl. A seqüência dos iniciadores utilizados neste experimento foi selecionada a partir de uma região alvo da seqüência genômica do WSSV (GenBank, número de acesso [AF440570](#)). Os iniciadores geram um amplicon de 81 pb. A reação de amplificação ocorreu conforme mostrado na Tabela 1, e a especificidade do produto amplificado foi verificada através da curva de dissociação (72°C a 95°C) para a verificação da temperatura de *melting* de cada produto.

As amostras foram testadas em duplicata e a curva padrão utilizada para quantificação das amostras foi obtida através de diluições seriadas (10X) de um plasmídeo recombinante com uma seqüência do genoma do vírus (número de cópias/µl conhecido).

Tabela 1: Programas utilizados nos tipos de PCR realizadas durante o estudo.

Tipo de PCR	Programas das PCRs	Numero total de ciclos
<i>Nested</i> PCR	Primeiro passo: 94°C por 2 min seguido de 39 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min 30 s, 72°C por 2 min e extensão final de 5 min a 72°C. Segundo passo: um ciclo a 94°C por 3 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final de 5 min a 72°C.	39 e 36
PCR em Tempo Real	95°C por 15 min seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 10 s.	40
PCR GAPDH	94°C por 30 s, 52°C por 30 s, 68° por 1 min 30 s e uma extensão final de 7 min a 72°C.	35

2.2.6 Marcação não-radioativa da sonda de DNA

A sonda utilizada no *Slot Blot*, *Dot Blot* e na hibridização *in situ* foi marcada não-radioativamente com digoxigenina (DIG), através de PCR *nested*, com base no procedimento descrito por Müller (2004). O primeiro passo da reação foi realizado segundo protocolo modificado de Lo et al. (1996), conforme descrito na sessão 2.1.4. Como *template* foi utilizado um plasmídeo recombinante contendo o produto de 1447pb proveniente da PCR *nested*. O fragmento foi clonado no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega), conforme as instruções do fabricante. Já para o segundo passo foi utilizado 1 µl do produto do primeiro passo, 2U de Taq DNA Polimerase (Biotools), tampão de reação da enzima 1X, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP, 0,144 mM de dTTP, 0,072 mM de DIG-dUTP (Roche) e 0,14 µM de cada primer. O volume final da reação foi de 25 µl. O programa utilizado para o segundo passo também foi o mesmo do protocolo modificado de Lo et al. (1996) descrito na sessão 2.1.4.

2.2.7 Dot e Slot Blot

As técnicas de *Dot* e *Slot Blot* foram realizadas com base no procedimento descrito por Müller (2004). Amostras de DNA extraído dos pleódodes dos camarões foram desnaturadas por 10 minutos a 100°C, e então imobilizadas (1µl) em membrana de nylon, sob vácuo, utilizando-se o sistema *Hybri-Slot Manifold* (Life Technologies). Posteriormente à aplicação das amostras, a membrana foi lavada com NaOH 0,4 M e SSC 2X, e o DNA ligado à membrana através da exposição à luz Ultra-Violeta por 3 min (*cross-linking*). Após incubação a 65°C por 2 horas em solução de pré-hibridização (SSC 5X, reagente de bloqueio 1%, SLS 0,1%, SDS 0,2%), a membrana foi incubada *overnight* a 65°C com a sonda marcada com DIG, que foi previamente desnaturada.

A membrana foi lavada, sucessivamente, com tampão 1 (SSC 2X, SDS 0,1%), tampão 2 (SSC 0,5X, SDS 0,1%) e tampão 3 (ácido maléico 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,3%) e, então, foi incubada em solução de bloqueio 1X (Roche) por 30 minutos a temperatura ambiente (TA). A imunodeteção foi realizada com anticorpo anti-DIG conjugado à fosfatase alcalina (Roche), diluído em solução de bloqueio 1X, por incubação com a membrana por 30 min (TA). Após ter sido mantida em tampão de lavagem 3 por 30 min, a membrana permaneceu submersa em tampão de detecção (Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 9,5) por 5 minutos. A detecção foi realizada incubando-se a membrana com NBT/BCIP em tampão de detecção no escuro por até 16 horas.

2.2.8 Hibridização *in situ*

As amostras fixadas em Davidson's foram desidratadas, incluídas em parafina, segundo método descrito por Lightner (1996) e seccionadas na espessura de 4 a 5 µm. Os cortes foram coletados em lâminas silanadas (Silane-Prep Slides, Sigma), para posterior hibridização *in situ* e os cortes subsequentes do mesmo bloco foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise histopatológica. A técnica de hibridização *in situ* foi realizada conforme recomendado pela OIE, utilizando o método descrito por Nunan e Lightner (1997) com algumas modificações.

Resumidamente, as lâminas foram desparafinadas e hidratadas em uma série etanólica decrescente (100% → 50%) e enxaguadas com água destilada. Em seguida, foram incubadas com

TNE (Tris-HCl 50 mM, NaCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,4) por 5 min, e sobre os cortes foi pipetada proteinase K. Após incubação a 37°C por 15 min, as lâminas foram lavadas em 0,4% de formaldeído e em SSC 2X (NaCl 300 mM, Citrato de Sódio 30 mM). Posteriormente à incubação por 30 min a 37°C em tampão de hibridização (SSC 4X, formamida 50%, BSA 0,2%, Ficoll 400 0,2%, PVP 360 0,2%), o tecido desnaturado foi coberto com a sonda marcada com DIG, também desnaturada, sendo as lâminas incubadas *overnight* a 42°C.

As lâminas foram lavadas em concentrações decrescentes (2X, 1X, 0,5X) do tampão SSC, em tampão I (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM) e incubadas com tampão II (Reagente de bloqueio 0,5% no tampão I) durante 15 min a 37°C. A imunodeteção foi realizada com anticorpo anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina (Roche), diluído no tampão II (1:500). Após incubação de 30 min a 37°C, as lâminas foram lavadas em tampão I, tampão III (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, pH 9,5) e incubadas no escuro com a solução de revelação (4,5 µl de NBT e 3,5 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo fosfato em tampão III). A reação foi interrompida pela lavagem com o tampão IV (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) por 15 min. Os cortes foram contra-corados com Bismarck Brown Y 0,5%, desidratados e as lâminas montadas com lamínula e meio de montagem (Permount).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Integridade do DNA extraído das amostras

O DNA genômico extraído de todas as amostras estava íntegro, como pode ser visto pelo perfil eletroforético representativo (Figura 1).

Este resultado foi confirmado pela amplificação do gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase – GAPDH (Figura 2). O tamanho do fragmento amplificado foi de 292 pb, como esperado. Este resultado indicou ainda a ausência de inibidores enzimáticos nas amostras cuja presença poderia inibir a reação de amplificação para a detecção do WSSV.

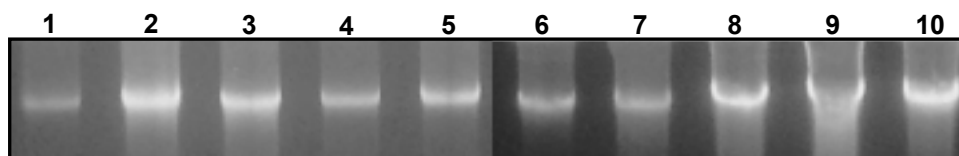


Figura 1: Eletroforese representativa em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, apresentando a integridade e qualidade do material genômico extraído das amostras coletadas. **1 - 10)** Amostras de DNA extraído de animais coletados na Fazenda Zaguaza.

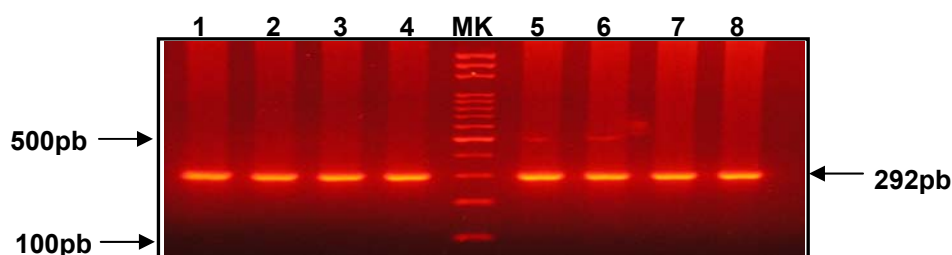


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos da PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo GAPDH. As amostras são oriundas da segunda coleta da Fazenda Tambaqui. **1 - 8)** Amostras da Fazenda Tambaqui. **MK)** Marcador de peso molecular (100 pb DNA *ladder*).

2.3.2. Resultados das PCRs *nested* para detecção do vírus da Mancha Branca

Dos 56 animais coletados nas seis fazendas visitadas, 50 animais foram analisados para a detecção do WSSV. A técnica de PCR *nested* foi utilizada para detectar previamente quais eram os animais portadores do vírus, uma vez que praticamente todos se apresentavam como animais assintomáticos no momento da coleta.

Dos 50 animais analisados, 32 apresentaram reação positiva para mancha branca, o que representa 64% de animais infectados (Tabela 2).

Tabela 2: Resultado dos diagnósticos obtidos pela técnica de PCR para os animais analisados (n= 50). A distribuição dos animais por fazenda está indicada.

Fazenda	Localidade	Animais analisados	Animais com reação positiva para WSSV	Animais com reação negativa para WSSV
Zaguaza	Laguna	6	3	3
Pontal	Gov. Celso Ramos	10	10	0
Santa Rosa	Laguna	8	2	6
Tambaqui (1ª coleta)	Araquari	8	8	0
Tambaqui (2ª coleta)	Araquari	8	0	8
Pescaria Brava	Laguna	10	9	1
Total		50	32	18

Cabe salientar que os animais coletados na segunda coleta da Fazenda Tambaqui são provenientes do mesmo povoamento dos animais da primeira coleta. O que difere os dois grupos é o momento da coleta: a primeira foi realizada em março de 2007 e a segunda em dezembro de 2007. No entanto, como pode ser visto na tabela acima e na figura 3, em todos os animais da primeira coleta houve amplificação da seqüência específica do vírus, enquanto nos animais da segunda coleta não foi verificada reação positiva. Cabe ressaltar que as coletas ocorreram de forma aleatória, trabalhando-se com diferentes tanques, tanto na primeira coleta quanto na segunda.

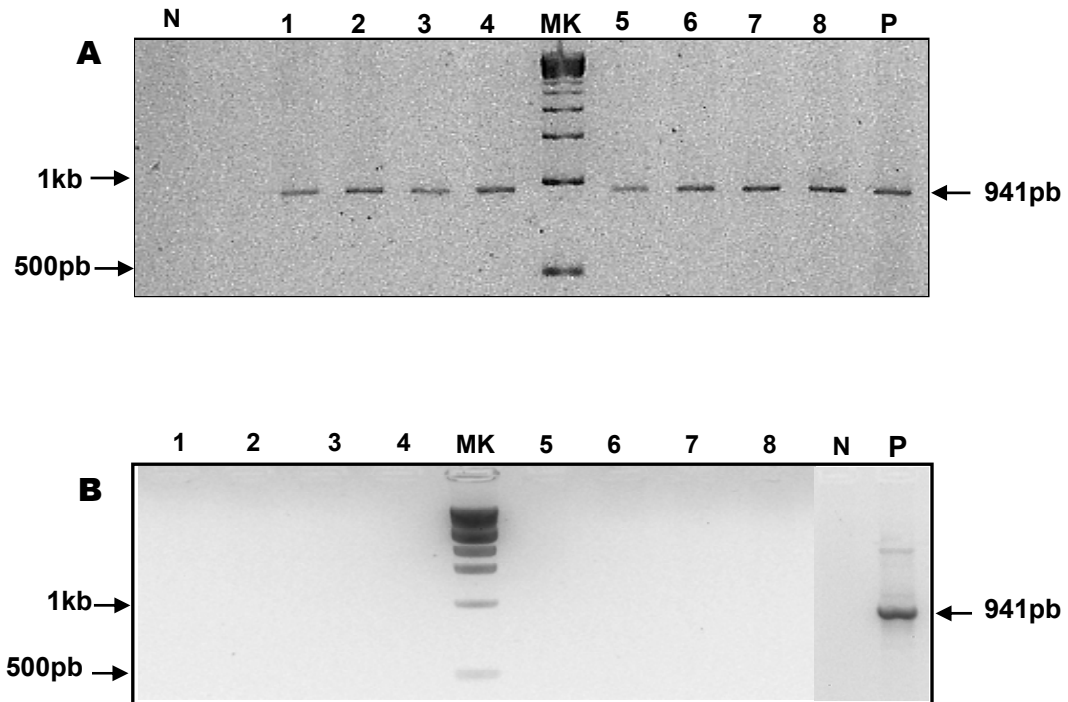


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 2% apresentando o resultado da *nested* PCR para detecção do WSSV para as amostras da Fazenda Tambaqui. **(A)** Primeira coleta e **(B)** segunda coleta. **1 – 8)** Amostras analisadas da Fazenda Tambaqui. **MK)** Marcador de peso molecular 1Kb. **N)** Controle negativo. **P)** Controle positivo.

2.3.3 Quantificação da carga viral por PCR em Tempo Real

Para a elaboração da curva padrão da PCR em Tempo Real foi utilizado um plasmídeo recombinante nas concentrações de $3,55 \times 10^8$ até 3,55 cópias virais/ μl , sendo que cada concentração foi analisada em duplicata. As médias dos valores do CT (*Cycle threshold*) de cada concentração resultaram em uma curva padrão (valor de CT pelo número de cópias virais), com coeficiente de correlação linear (r^2) de 0,91 (Figura 4).

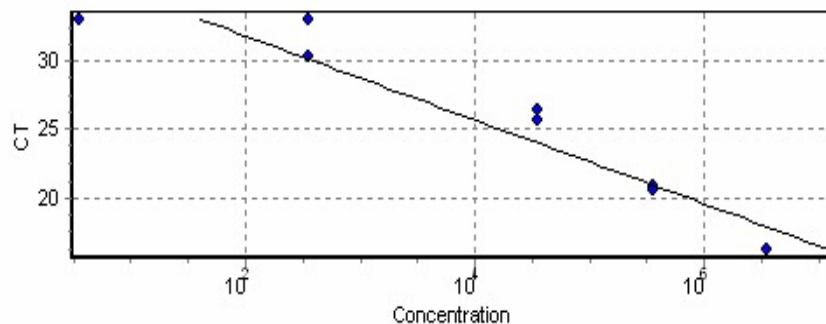


Figura 4: Curva padrão (valor de CT pelo número de cópias virais) utilizada para a quantificação da carga viral das amostras analisadas por PCR em Tempo Real.

Os resultados mostraram que a PCR em Tempo Real detectou, com segurança, até 3,55 cópias virais por reação. Diluições abaixo deste limite, contendo, por exemplo, uma cópia por reação (ou uma cópia/ μl) algumas vezes podem gerar resultados positivos e outras vezes não. Esta

observação deve-se, provavelmente, ao fato de que uma diluição contendo precisamente uma cópia/ μl é difícil de ser obtida.

Algumas amostras foram quantificadas por PCR em Tempo Real com o objetivo de realizar uma análise comparativa da sensibilidade dos métodos de detecção utilizados neste trabalho, ou seja, PCR, *Dot Blot*, Histopatologia e Hibridização *in situ*. O número de cópias virais foi calculado pela interpolação do *Cycle threshold* (CT) determinado experimentalmente (curva padrão). A partir desse número de cópias, os resultados finais foram expressos como a média do número de cópias de WSSV por microlitro de amostra, já que cada amostra foi feita em duplicata (Tabela 3). As amostras B11, B15, B14, B21 e B25 são provenientes da Fazenda Pescaria Brava, enquanto a T33 e T34 são provenientes da primeira coleta na Fazenda Tambaqui e a T41 e T51 são da segunda coleta realizada na mesma fazenda.

Tabela 3: Valores médios do número de cópias virais de WSSV por microlitro de amostra extraída dos pleópodes de *L. vannamei* previamente diagnosticados como portadores de WSSV por PCR *nested*.

Amostra	Valor do Ct	Quantificação (nº de cópias/ μl)
B15	13,72	$1,3 \times 10^9$
B25	15,34	$3,7 \times 10^8$
B21	15,13	$4,5 \times 10^8$
B11	13,27	$5,0 \times 10^8$
T34	26,26	$4,0 \times 10^7$
T33	29,15	$4,3 \times 10^6$
T41	31,97	$2,9 \times 10^5$
T51	30,06	$4,1 \times 10^5$
B14	-	0

Com base nas quantificações mostradas na Tabela 3, as amostras B15, B25, B21, B11, T33 e T34 possuem carga viral alta, enquanto as amostras T41 e T51 são exemplos de amostras cuja carga viral pode ser considerada moderada a alta. A amostra B14 é um exemplo de amostra negativa.

A especificidade do produto amplificado foi verificada pela análise da curva de *melting*, ou seja, pela análise da temperatura de dissociação de cada produto da PCR, sendo que as temperaturas utilizadas para a construção do respectivo gráfico variaram de 72°C a 95°C (Figura 5).

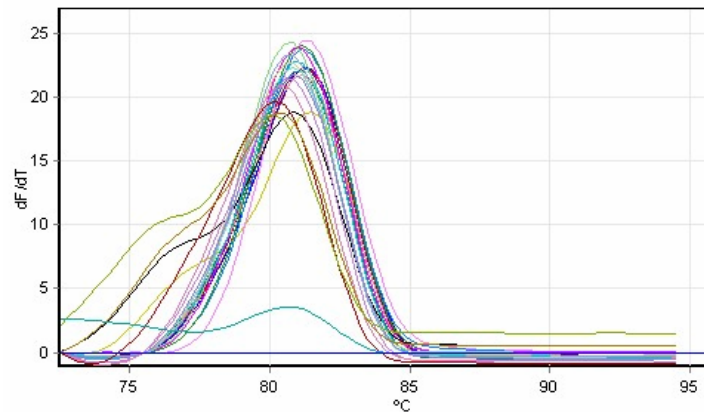


Figura 5: Curva de dissociação para verificar a especificidade dos produtos formados pela PCR em Tempo Real.

2.3.4 Comparação entre *Dot* e *Slot Blot*, PCR *nested* e PCR em Tempo Real

A especificidade e a marcação da sonda foram confirmadas, inicialmente por *Dot Blot*. Não houve reação, ou seja, hibridização da sonda com o DNA genômico de camarão; amostra esta obtida de um animal cujo resultado de PCR foi negativo para o WSSV (controle negativo). Por outro lado, houve reação positiva, tanto para amostras de plasmídeo recombinante, contendo como inserto uma seqüência do genoma viral (controle positivo), como para as amostras de DNA extraídas de pleópodes de animais infectados, como pode ser visto na figura 6.

Para a análise da sensibilidade da técnica de *blotting*, o mesmo plasmídeo recombinante utilizado para a elaboração da curva padrão do PCR em Tempo Real foi diluído, partindo-se da concentração de 2×10^{19} até 2×10^3 cópias/ μ l. A hibridização com a sonda para a detecção do WSSV, marcada não-radioativamente, foi realizada por *Slot Blot*. Reação positiva foi observada até o limite de 2×10^{17} cópias virais (Figura 7).

Com o intuito de determinar a sensibilidade da PCR *nested* foi utilizado como molde da reação (1 μ l) o mesmo plasmídeo recombinante nas mesmas diluições utilizadas para a elaboração da curva padrão do PCR em Tempo Real, partindo-se da concentração de $3,55 \times 10^8$ até 3,55 cópias virais/ μ l. A capacidade de detecção da PCR *nested* foi de até $3,55 \times 10^5$ cópias virais (Figura 8).

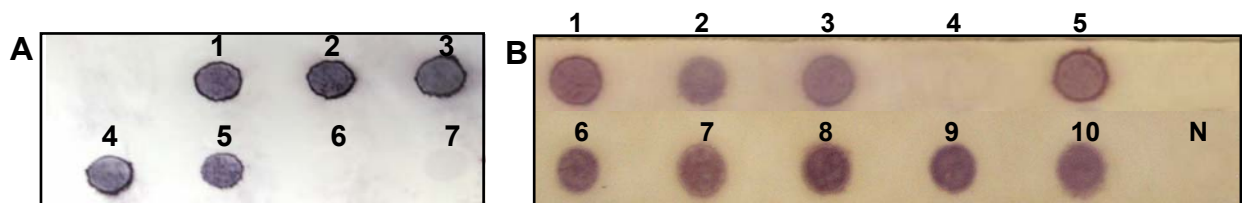


Figura 6: *Dot Blot* para testar a marcação e a especificidade da sonda contra o WSSV. **(A)** Foi utilizado como amostra um plasmídeo recombinante, contendo como inserto uma seqüência do genoma viral, nas seguintes concentrações: **1)** 13,6 μ g, **2)** 10,2 μ g, **3)** 6,8 μ g, **4)** 3,4 μ g e **5)** 1,7 μ g. Em **6)** Tampão de desnaturação e **7)** Controle negativo. **(B)** Amostras extraídas de animais coletados na Fazenda Pescaria Brava, que foram previamente analisados por PCR. Foi utilizado em cada *dot* 1 μ l de amostra bruta. **1 - 5)** Amostras B11 a B15. **6 - 10)** Amostras B21 a B25. **N)** Controle negativo.

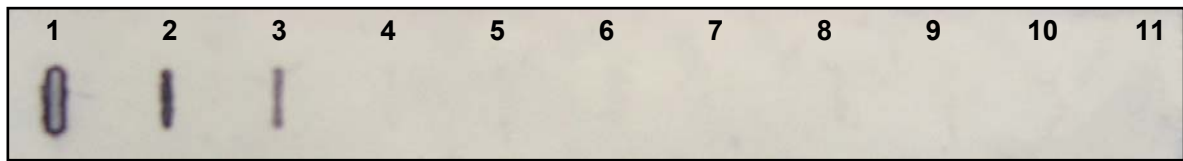


Figura 7: *Slot Blot* para análise da sensibilidade da técnica de *blotting* na detecção de amostras positivas para o WSSV. 1 - 11) Diluições do plasmídeo recombinante nas concentrações: 2×10^{19} , 2×10^{18} , 2×10^{17} , 2×10^{15} , 2×10^{13} , 2×10^{11} , 2×10^9 , 2×10^7 , 2×10^5 e 2×10^3 cópias virais, respectivamente.

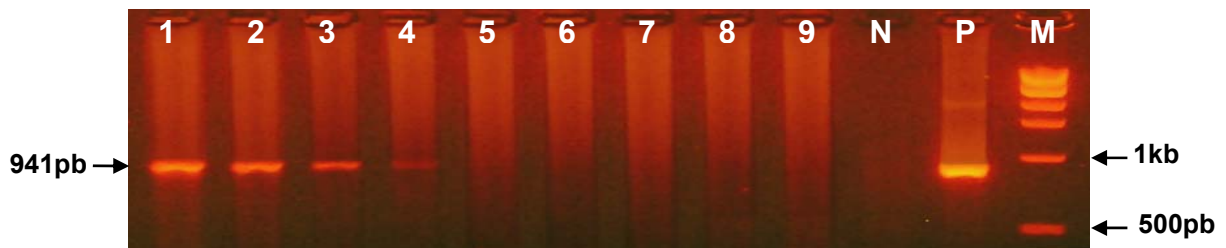


Figura 8: Análise de sensibilidade da PCR *nested* para a detecção do WSSV, utilizando como molde um plasmídeo recombinante em diluição seriada (10 vezes). Números de 1-9) $3,55 \times 10^9$, $3,55 \times 10^7$, $3,55 \times 10^6$, $3,55 \times 10^5$, $3,55 \times 10^4$, $3,55 \times 10^3$, $3,55 \times 10^2$, $3,55 \times 10^1$, $3,55$ cópias virais, respectivamente. N) controle negativo. P) controle positivo, M) Marcador de peso molecular 1kb.

Na comparação das três metodologias moleculares utilizadas, a PCR em Tempo Real foi a que apresentou a maior sensibilidade, sendo capaz de detectar até 3,55 cópias virais/ μ l, ou seja, 3,55 cópias virais por reação (Tabela 4). Esse resultado era esperado ao comparar esta metodologia com a de *blotting*. No entanto, com relação à técnica de PCR *nested* esperava-se uma sensibilidade mais próxima àquela observada para a PCR em Tempo Real.

Tabela 4: Comparação entre os métodos de diagnóstico (*Blotting*, PCR *nested* e PCR em Tempo Real) com relação à sua sensibilidade.

Método diagnóstico	Limite de detecção (cópias virais)	Sensibilidade
<i>Blotting</i>	2×10^{17}	+
PCR <i>nested</i>	$3,55 \times 10^5$	++
PCR em Tempo Real	3,55	+++

+ = sensibilidade baixa, ++ = sensibilidade moderada, +++ = sensibilidade alta

Essa diferença na sensibilidade pode ser evidenciada com base na análise de algumas amostras de camarões com diferentes cargas virais, realizada pelos três métodos mencionados. Enquanto a amostra B14 apresentou resultado negativo pelas três técnicas, outras amostras, como a T41 e T51, apresentaram resultados conflitantes para as técnicas de PCR *nested* e PCR em Tempo Real. Na primeira, o vírus da Mancha Branca não foi detectado (Figura 3B), enquanto na segunda, houve amplificação da seqüência viral alvo, como pode ser visto na Tabela 3. Por outro lado, outras

amostras, como por exemplo, B11 e B25, apresentaram resultados idênticos, ou seja, resultados positivos pelas três metodologias, inclusive para o *Dot Blot*, o qual mostrou ser o menos sensível (Figura 6B).

2.3.5 Hibridização *in situ*

Após a realização de vários testes, foram observadas células marcadas nas amostras previamente diagnosticadas como portadoras do WSSV, o que demonstrou a eficiência das condições padronizadas para a técnica de hibridização *in situ* (ISH). Os cortes de tecidos de camarões infectados com WSSV reagiram com a sonda marcada com Digoxigenina, o que foi evidenciado pela formação de um precipitado de cor arroxeadada em algumas células.

Das amostras analisadas por histopatologia (coloração HE) e por ISH, somente naquelas com carga viral moderada a alta foram observadas células com corpos de inclusão intranucleares e detectadas células marcadas pela sonda de DNA específica para o WSSV (Figura 9 e 10). Em algumas células foi possível visualizar a cromatina marginalizada pelo corpo de inclusão, característica dos últimos estágios de replicação do vírus (Figura 9E).

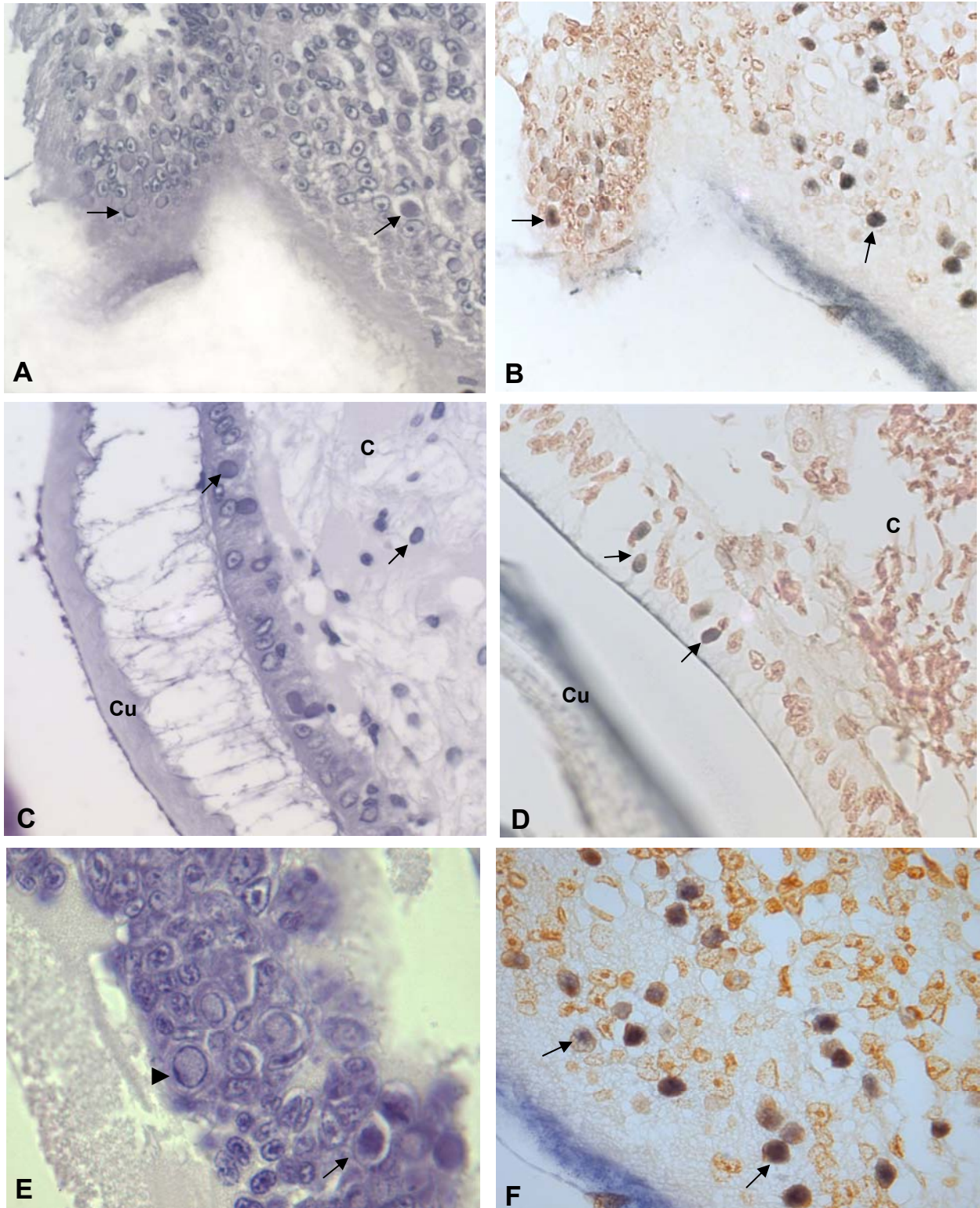


Figura 9: Cortes histológicos de *L. vannamei* infectados com WSSV corados com H.E. (coluna da esquerda) e submetidos à técnica de hibridização *in situ* (coluna da direita). **A-D)** Pares de cortes consecutivos do tecido epitelial subcuticular do intestino (primeiro par) e do tecido epitelial subcuticular da carapaça (segundo par). Cu = Cutícula, C = Tecido conjuntivo. (400X). **E)** Tecido epitelial com células em diferentes estágios de replicação viral. ► = cromatina marginalizada (1000X). **F)** Tecido epitelial com diferentes intensidades de marcação das células (1000X). As setas indicam exemplos de corpos de inclusão intranucleares e núcleos hipertrofiados que são basófilos em coloração H.E. e marcados com um precipitado azul escuro quando reagem com a sonda de DNA. Espessura dos cortes: 4µm.

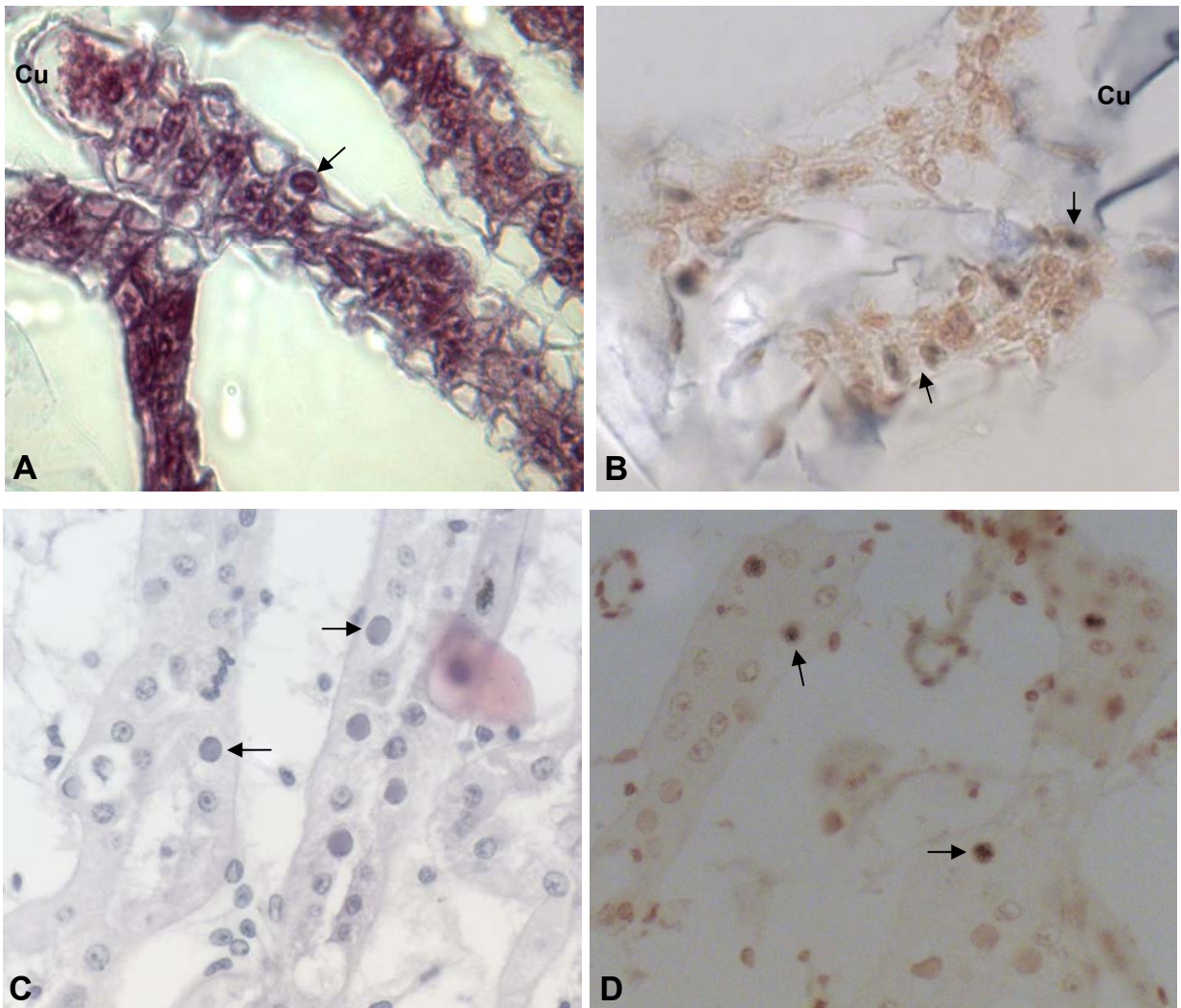


Figura 10: Cortes histológicos de *L. vannamei* infectados com WSSV corados com H.E. (coluna da esquerda) e submetidos à técnica de hibridização *in situ* (coluna da direita). **A e B)** Tecido epitelial da brânquia (1000 e 400X, respectivamente). **C e D)** Glândula antenal (400 e 200X, respectivamente). Cu = Cutícula, As setas indicam exemplos de corpos de inclusão intranucleares e núcleos hipertrofiados que são basófilos em coloração H.E. e marcados com um precipitado azul escuro quando reagem com a sonda de DNA. Espessura dos cortes: 4 μ m.

Não foram observadas células marcadas com a sonda de DNA na amostra negativa, e tanto nessa amostra, quanto nas positivas de carga moderada, não foram observados corpos de inclusão (dados não mostrados).

O grau de severidade da infecção refletiu a carga viral quantificada pela PCR em Tempo Real, uma vez que nas amostras com carga viral alta foi observado maior número de células marcadas e mais tecidos atingidos, em comparação com as amostras com carga viral moderada. Além disso, verificam-se células marcadas com diferentes intensidades em todas as amostras (Figura 9F).

O tecido mais afetado foi o epitélio subcuticular do intestino anterior, a epiderme abaixo da carapaça, seguido pelo tecido conjuntivo, brânquias e glândula antenal.

2.4 DISCUSSÃO

Diversos trabalhos têm sido publicados, comparando diferentes métodos de diagnóstico para a detecção de vírus em diversas espécies de camarão (Chapman et al., 2004; Dupuy et al., 2004; Durand et al., 2003; Shekhar et al., 2006). Porém, até onde temos conhecimento, não há nenhum trabalho comparando PCR *nested*, PCR em Tempo Real, *Slot Blot* e Hibridização *in situ* para detecção do WSSV em *Litopenaeus vannamei* cultivados. A grande maioria desses trabalhos utiliza animais experimentalmente infectados. Isso permite um maior controle sobre o experimento e sobre os dados gerados, mas algumas vezes os resultados não refletem o que realmente ocorre nos cultivos, uma vez que nos mesmos existe a interação entre o animal e os vários fatores abióticos, associados às condições de manejo.

No presente trabalho alguns métodos de diagnóstico recomendados pela OIE, e que são aqueles mais utilizados em pesquisas e em laboratórios de diagnóstico para a detecção do WSSV, foram comparados com relação à sua sensibilidade.

O valor da quantificação da carga viral de cada amostra analisada neste estudo está apresentado em número de cópias virais/ μl ou número de cópias virais/reacção. Ambas as unidades possuem, aqui, o mesmo significado, uma vez que em cada reacção foi utilizado $1\mu\text{l}$ de molde. A quantificação do número de cópias virais por PCR em Tempo Real mostrou que das 9 amostras analisadas, 6 apresentaram entre $4,3 \times 10^6$ e $1,3 \times 10^9$ cópias virais/ μl , 2 apresentaram a média de $3,5 \times 10^5$ cópias e em apenas 1 não houve amplificação.

Ainda não há consenso entre os pesquisadores quanto à classificação da carga viral de uma amostra. Em seu trabalho, Kiatpathomchai e colaboradores (2001), por exemplo, atribuíram como amostras com carga alta aquelas com mais de 2×10^4 cópias virais por reacção. Quantidades em torno de 2×10^3 cópias virais foram consideradas como moderadas, enquanto quantidades entre 20 e 2×10^2 cópias virais foram consideradas baixas (Tabela 5).

Outros autores utilizaram em seus estudos *kits* comerciais para verificar os níveis de infecção de determinadas amostras. Peng e colaboradores (2001) fizeram uso do *kit WSSV Specific Sequence Amplification* (Farming Intelligene Tech., Taipei, Taiwan), que gradua a infecção por WSSV em quatro níveis de severidade. Níveis de 1 a 4 (infecção muito severa a infecção muito leve) correspondem, respectivamente, a $>2 \times 10^3$, 2×10^3 , 2×10^2 e $\leq 2 \times 10^1$ cópias virais por reacção de PCR. Shekhar e colaboradores (2006), por sua vez, utilizaram o *kit Single tube WSSV nested PCR detection* (Bangalore Genei Ltd.). Segundo o fabricante, acima de 10^5 cópias virais/reacção a infecção pode ser considerada como severa. Entre 10^3 a 10^5 cópias virais/reacção o nível de infecção é considerado alto a moderado, enquanto uma infecção leve corresponde de 10 a 10^2 cópias virais (Tabela 5).

Tabela 5: Compilação de dados relativos à classificação da carga viral, provenientes de três trabalhos publicados sobre o tema.

Classificação da carga viral/infecção	Carga viral (cópias virais/reação)		
	Peng et al. (2001)	Kiatpathomchai et al. (2001)	Shekkhar et al. (2006)
Alta/Severa	$>2 \times 10^3$	2×10^4	$>10^5$
Moderada	2×10^3	2×10^3	10^3 a 10^5
Baixa/Leve	2×10^2	20 a 2×10^2	10 a 10^2
Muito baixa/leve	$\leq 2 \times 10^1$	-	-
Referência	Peng et al. (2001)	Kiatpathomchai et al. (2001)	Shekkhar et al. (2006)

Em nosso trabalho, arbitramos como carga viral alta ou infecção severa, aquelas com mais de 5×10^5 cópias/ μ l, como carga viral alta a moderada aquelas entre 5×10^5 a 1×10^3 cópias/ μ l e como carga baixa ou infecção leve aquelas entre 1×10^2 e 10 cópias/ μ l. Para tanto, levamos em consideração o Esquema de Graduação da Severidade de uma Infecção publicado por Lightner (1996), além da análise dos resultados gerados no presente estudo e dos dados dos três trabalhos citados na tabela 5.

Segundo o esquema de graduação da severidade de uma infecção publicado por Lightner (1996), que vai dos níveis 0 a 4 (0 = não detectado; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = alto e 4 = severo), são consideradas infecções altas e severas aquelas onde as lesões características da doença estão presentes num nível moderado a severo. Nas nossas amostras que continham em média $3,5 \times 10^5$ cópias virais, não foram observadas lesões, o número de células afetadas era reduzido e os animais não apresentavam sinais clínicos da doença, se enquadrando, portanto, no nível de severidade 2 (moderado), segundo o esquema de graduação de Lightner.

Peng e colaboradores (2001) relataram em seu trabalho que a graduação das infecções é um parâmetro importante para o acompanhamento do vírus da Mancha Branca em sistemas de cultivo, de modo a contribuir para um manejo mais eficaz de pós-larvas e reprodutores.

Alguns resultados gerados pela técnica de PCR *nested* foram conflitantes com aqueles gerados pela PCR em Tempo Real. Em nenhuma das amostras provenientes da segunda coleta na Fazenda Tambaqui foi detectado o vírus por PCR *nested*. No entanto, as mesmas amostras apresentaram resultado positivo quando analisadas por PCR em Tempo Real. Isto pode ter ocorrido pelo fato de as amostras estarem muito próximas ou abaixo do limite de detecção do método de PCR, que foi de $3,55 \times 10^5$ cópias virais/reação. Estes resultados sugerem que os animais da segunda coleta, apesar de terem sobrevivido ao surto que ocorreu no período da primeira coleta, continuavam com o vírus em seus tecidos, porém com uma carga viral mais baixa do que aqueles da primeira coleta.

Embora a PCR seja a técnica mais utilizada atualmente para a detecção do WSSV e seja considerada bastante sensível, ela possui algumas desvantagens. Alguns autores têm relatado que homogeneizados de alguns tecidos de camarão contêm inibidores da PCR, e que algumas amostras com resultado positivo para *Dot Blot* foram negativas para PCR, provavelmente pela presença desses inibidores (Nunan et al., 2000; Wang et al., 1996). Nesses casos, as técnicas de hibridização *in situ* e *Dot Blot* apresentam a vantagem de não dependerem da amplificação de uma seqüência alvo pela

enzima Taq DNA Polimerase, mas simplesmente do anelamento de uma sonda específica para uma determinada sequência alvo.

Além de resultados falsos negativos, a técnica de PCR pode gerar falsos positivos. Chang et al. (2001) em seu trabalho sobre a verificação da existência do WSSV no siri azul *Callinectes sapidus*, fez uso da hibridização *in situ* para excluir a possibilidade de seus resultados positivos terem sido gerados devido a contaminação de DNAs não provenientes da amostra. Cabe salientar que cuidados no preparo e manipulação da amostra e dos reagentes e, finalmente, na realização da reação de PCR propriamente dita, devem ser sempre um foco importante para evitar este tipo de problema (Marques et al., 2006).

Porém, apesar da possibilidade de serem gerados falsos resultados, o diagnóstico por PCR mostrou-se uma ferramenta fundamental para o acompanhamento dos cultivos, uma vez que os únicos animais que apresentavam coloração avermelhada do corpo foram os provenientes da Fazenda Pescaria Brava. O restante dos animais amostrados eram assintomáticos no momento da coleta.

Com relação à sensibilidade dos métodos, a PCR em Tempo Real apresentou-se como o mais sensível, sendo capaz de detectar até 3,55 cópias virais/reação, ou 0,015 fg de plasmídeo recombinante. Esses valores estão de acordo com os valores encontrados por outros autores. O método descrito por Sritunyalucksana et al. (2006) foi capaz de detectar até 5 cópias/reação, enquanto o desenvolvido por Durand e Lightner (2002) detectou até 4 cópias virais. Apesar de ser a técnica mais sensível, a PCR em Tempo Real também é a que apresenta os maiores custos, além da demanda de pessoal treinado para sua realização e interpretação dos resultados.

Apesar de raramente apresentar problemas com falsos positivos, o *Dot Blot* mostrou-se menos sensível que a PCR *nested*. Enquanto o limite de detecção da PCR *nested* foi de $3,55 \times 10^5$ cópias virais/reação, o limiar do *Dot Blot* foi de 2×10^{17} cópias. No entanto, a despeito de não ser tão sensível quanto as PCRs, a técnica de *blotting* é menos onerosa e o seu procedimento é relativamente simples. Assim, ela seria mais indicada para uma classificação inicial e rápida das amostras. Porém, em caso de animais com carga viral baixa, seria necessária a confirmação por métodos mais sensíveis. Dupuy et al. (2004) observaram alta sensibilidade do PCR, quando comparado ao *Dot Blot*, uma vez que o *Dot Blot* não foi capaz de detectar DNA de WSSV em homogeneizados usados para infecção experimental de camarões, que continham quantidades pequenas de vírus.

A comparação da sensibilidade do PCR e *Dot Blot* para a detecção do IHNV por Nunan e colaboradores (2000) mostrou que o PCR pôde detectar até 50 fg/ μ l de plasmídeo recombinante, enquanto a reação de *Dot Blot* detectou até 5 pg do mesmo plasmídeo. No estudo de Moser (2005) com uma população de *L. vannamei*, uma diferença na determinação da prevalência do IHNV foi vista por PCR e por *Dot Blot*. Enquanto a prevalência foi igual a 54,8% de acordo com os resultados obtidos por PCR, o percentual de animais positivos para o vírus foi igual a 65,1% por *Dot Blot*.

A hibridização *in situ* foi capaz de detectar o WSSV em amostras com carga viral alta a moderada, porém, mesmo naquelas que tinham uma carga viral alta, e conseqüentemente muitas células marcadas, não foi observado regiões necrosadas.

Estes dados corroboram aqueles encontrados por Chapman et al. (2004). Os autores comentam que, diferentemente dos resultados obtidos por Chang et al. (2001), não foi possível detectar a presença de WSSV por hibridização *in situ* ou histopatologia em indivíduos considerados positivos fracos, segundo as condições de PCR por eles empregadas. Esses mesmos autores acreditam que um dos motivos para essa diferença entre os resultados seja a maior concentração de Taq DNA polimerase nas suas PCRs (concentração 4 vezes maior que a utilizada por Chang e colaboradores em 2001). É importante ressaltar que uma concentração maior de Taq DNA polimerase numa PCR tende a aumentar a eficiência da mesma. Assim, amostras classificadas por Chang et al. (2001) como positivas fracas, provavelmente seriam diagnosticadas como positivas fortes, seguindo o protocolo de Chapman et al. (2004).

O grau de severidade da infecção foi condizente com a carga viral quantificada pela PCR em Tempo Real, já que nas amostras com carga viral alta foram observados mais tecidos atingidos e mais células marcadas do que nas amostras com carga viral moderada. As marcações limitaram-se basicamente aos núcleos infectados e foram mais intensas quando havia hipertrofia do núcleo, como pode ser vista na figura 9F. O mesmo foi observado por Durand et al. (1996) para a espécie *Penaeus setiferus*.

Apesar de não mostrar um grau de sensibilidade comparável aos dois tipos de PCR empregados neste estudo, a hibridização *in situ* é uma técnica que apresenta várias características positivas. Outras técnicas de biologia molecular, como a PCR, permitem a detecção de mRNA ou DNA extraídos de tecidos, mas não permitem observar a distribuição do DNA ou de seus transcritos em um tipo de população celular ou em regiões de diferentes tecidos (Silva-Valenzuela et al., 2006).

Outra questão a ser reforçada é um aspecto positivo da utilização da hibridização *in situ* rotina de um laboratório de patologia. Os tecidos emblocados em parafina têm alta durabilidade e podem ser arquivados por longos períodos. Devido à importância desses arquivos mantidos em laboratórios de patologia, existe um grande interesse por parte dos patologistas em padronizar a técnica de hibridização *in situ* para utilizá-la na rotina desses laboratórios. Nesse sentido, a mesma mostra-se mais interessante que a histopatologia, pois as células afetadas pelo vírus são mais facilmente localizadas que nas lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.), que por sua vez precisam ser analisadas por pessoas com bastante experiência.

Além disso, o diagnóstico por H.E. depende da visualização de lesões, células com corpos de inclusão e núcleos hipertrofiados, que ocorrem somente após o vírus ter alcançado um certo nível de replicação. Por outro lado a hibridização *in situ* pode detectar o vírus em estágios iniciais da infecção, mesmo que ainda não sejam observados sinais clínicos da doença (Chang et al., 1996; Poulos et al., 1994).

Tang et al. (2005) em seu estudo com o vírus IMNV, relataram que a hibridização *in situ* foi mais sensível quando comparada com a análise histopatológica; tecidos que não mostravam sinais visíveis de infecção por exame das lâminas coradas com H.E., apresentaram resultado positivo de infecção quando testados com a sonda específica para IMNV. Assim, a técnica de hibridização *in situ* tem a capacidade de detectar a infecção viral nos estágios iniciais, determinar o nível da infecção e identificar os tecidos-alvo.

Nos estudos realizados na década de 90, os autores afirmavam que a hibridização *in situ* era um método bastante sensível, uma vez que era capaz de detectar o vírus da mancha branca mesmo antes do surgimento dos primeiros sinais clínicos da doença ou da observação dos corpos de inclusão intranucleares (Chang et al., 1996; Durand et al., 1996; Wang, C.S. et al., 1998). Na época, não havia métodos capazes de quantificar a carga viral, tendo os pesquisadores, apenas como parâmetro de comparação, a observação da presença e intensidade dos sinais clínicos. Posteriormente, o advento da PCR *multiplex* permitiu a quantificação da carga viral em função do padrão de amplificação frente a plasmídeos recombinantes, contendo quantidades distintas de uma dada seqüência do genoma do WSSV, bem como a inclusão de genes constitutivos do hospedeiro (Farming IntelliGene Tech. Corp., 2000; Kiatpathonchai et al., 2001). Recentemente, vários métodos sensíveis de quantificação da carga viral têm sido desenvolvidos (Durand et al., 2003; Durand e Lightner, 2002;). Conseqüentemente, novos estudos acerca da sensibilidade de diversas técnicas têm sido publicados, com base nesses novos métodos de quantificação (Shekhar et al., 2006; Sritunyalucksana et al., 2006). No entanto, até onde sabemos, não há estudos atuais avaliando a sensibilidade da hibridização *in situ* para WSS, tendo como base de comparação a quantificação da carga viral.

Em suma, os experimentos sugerem que a PCR, principalmente a em Tempo Real, é uma técnica de diagnóstico sensível para detectar WSSV em pleópodes infectados. Porém os fatores inibidores da PCR devem ser considerados quando da escolha dos tecidos apropriados para extração do DNA, de modo a prevenir resultados negativos falsos. Nesse sentido, o *Dot Blot* e a hibridização *in situ* teriam uma vantagem sobre o PCR, uma vez que permitem o uso desses tecidos que impedem a amplificação da seqüência alvo pela Taq DNA Polimerase. Também devido à sensibilidade da PCR e a possibilidade de problemas decorrentes de contaminação, positivos falsos podem ser evitados em testes de diagnóstico como o *Dot Blot* e a hibridização *in situ*. Cada método de diagnóstico possui vantagens e desvantagens. Por um lado, cabe ao laboratório de patologia ou de pesquisa estabelecer as melhores condições da realização destes métodos, a partir de material coletado apropriadamente. Por outro lado, cabe ao responsável técnico da fazenda e aos técnicos responsáveis pela fiscalização, conhecer os métodos disponíveis, de modo a poder avaliar qual deles se adequa melhor às suas necessidades. A hibridização *in situ*, associada a outras metodologias, pode contribuir para o diagnóstico mais preciso da doença da mancha branca e auxiliar no monitoramento dos cultivos de forma mais eficiente.

REFERÊNCIAS DO ARTIGO:

- Chang, P.S., Lo, C.F., Wang, Y.C., Kou, G.H., 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms* 27, 131-139.
- Chang, Y.S., Peng, S.E., Wang, H.C., Hsu, H.C., Ho, C.H., Wang, C.H., Wang, S.Y., Lo, C.F., Kou, G.H., 2001. Sequencing and Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Ribonucleotide Reductase Large Subunit Gene of the White Spot Syndrome Virus in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) from American Coastal Waters. *Marine Biotechnology* 3, 163-171.

- Chapman, R.W., Browdy, C.L., Savin, S., Prior, S., Wenner, E., 2004. Sampling and evaluation of white spot syndrome virus in commercially important Atlantic penaeid shrimp stocks. *Diseases of Aquatic Organisms* 59, 179–185.
- Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang, H.C., Lo, C.F., 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* 23, 165–173.
- Dupuy, J.W., Bonami, J.R., Roch, P.H., 2004. A synthetic antibacterial peptide from *Mytilus galloprovincialis* reduces mortality due to white spot syndrome in the palaemonid shrimp. *Journal of Fish Diseases* 27, 57–64.
- Durand, S.V., Lightner, D.V., Nunan, L.M., Redman, R.M., Mari, J., Bonami, J.R., 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for White Spot Baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 27, 59–66.
- Durand, S.V., Redman, R.M., Mohney, L.L., Tang-Nelson, K., Bonami, J.R., Lightner, D.V., 2003. Qualitative and quantitative studies on the relative virus load of tails and heads of shrimp acutely infected with WSSV. *Aquaculture* 216, 9–18.
- Durand, S.V.; Lightner, D.V. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases* 25, 381–389.
- Farming IntelliGene Technology Corporation. (<http://www.iq2000kit.com/>).
- Karunasagar, I.; Otta, S.K.; Karunasagar, I. 1997. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. *Aquaculture* 153, 9–13.
- Kiatpathomchai, W., Boonsaeng, V., Tassanakajon, A., Wongteerasupaya, C., Jitrapakdee, S., Panyim, S., 2001. A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 47, 235–239.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164, 201–220.
- Lightner, D.V., 1996. *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Los Angeles.
- Liu, B., Yu, Z., Song, X., Guan, Y., 2007. Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. *Journal of Invertebrate Pathology* 95, 87–92.
- Lo, C.F., Leu, J.H., Ho, C.H., Chen, C.H., Peng, S.E., Chen, Y.T., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., Wang, C.H., Kou, G.H., 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 25, 133–141.
- Lotz, J.M., Soto, A.M. 2002. Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50, 199–209.
- Maciel, M.L.T., 2002. Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação sanitária em cultivo de camarão marinho no Estado de Santa Catarina. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Marques, J.S., 2008. Contribuição para o monitoramento do vírus da Síndrome da Mancha Branca na carcinicultura de Santa Catarina. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- Marques, M.R.F., Moser, J.R., Muller, I.C. 2006. Virologia de crustáceos e métodos moleculares de diagnóstico, in: Silva-Souza, A.T. (Org.), Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. Abapoa, Maringá, pp. 159-185.
- Moser, J.R. 2005. Respostas bioquímicas do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), exposto ao inseticida Carbofuran e determinação da prevalência natural do vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoiética Infecciosa – IHHNV. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Müller, I.C. 2004. Caracterização e avaliação de metalotioneína como biomarcador de exposição a cádmio no mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Natividad, K.D.T., Nomura, N., Matsumura, M., 2008. Detection of White spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step *nested* PCR. *Journal of Virological Methods* 149, 28–34.
- Nunan L.M., Lightner D.V., 1997. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Virological Methods* 63, 193-201.
- Nunan, L.M., Poulos, B.T., Lightner, D.V., 2000. Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Marine Biotechnology* 2, 319–328.
- OIE, 2003. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Part 4. (http://www.oie.int/eng/en_index.htm).
- Peng, S.E., Lo C.F., Lin S.C., Chen, L.L., Chang, Y.S., Liu, K.F., Su, M.S., Kou, G.H., 2001. Performance of WSSV-infected and WSSV-negative *Penaeus monodon* postlarvae in culture ponds. *Diseases of Aquatic Organisms* 46, 165–172.
- Poulos, B.T., Mari, J., Bonami, J.R., Redman, R., Lightner, D.V., 1994. Use of non-radioactively labeled DNA probes for the detection of a baculovirus from *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization on fixed tissue. *Journal of Virological Methods* 49, 187-194.
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, 125-145.
- Shekhar, M.S., Azad, I.S., Ravichandran, P., 2006. Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 261, 1122–1127.
- Silva-Valenzuela, M.G., Almeida, F.C.S., Matizonkas-Antonio, L.F., Libório, T.N., Acquafreda, T., Cazal, C., Ferraz, A., Nunes, F.D., 2006. Hibridização *in situ* com sonda não-radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 42 (3), 207-213.
- Sritunyalucksana, K., Srisala, J., McColl, K., Nielsen, L., Flegel, T.W., 2006. Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. *Aquaculture* 255, 95-104.
- Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Poulos, B.T., Redman, R.M., Lightner, D.V., 2005. *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Diseases of Aquatic Organisms* 63, 261–265.
- van Hulten, M.C.W., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R.K., Vlak, J.M., 2000. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286, 7–22.

- Wang, C.H., Lo, C.F., Leu, J.H., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Chou, H.Y., Tung, M.C., Chang, C.F., Su, M.S., Kou, G.H., 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23, 239-242.
- Wang, S.Y., Hong, C., Lotz, J.M., 1996. Development of a PCR procedure for the detection of Baculovirus penaei in shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 25, 123–131.
- Wang, C.S., Tsai, Y.J., Chen, S.N. 1998. Detection of White Spot Disease Virus (WSDV) infection in shrimp using *in situ* hybridization. *Journal of Invertebrate Pathology* 72, 170-173.
- Wang, Y.C., Lo, C.F., Chang, P.S., Kou, G.H., 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture* 164, 221-231.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 21, 69–77.
- Zhang, J.S., Dong, S.L., Dong, Y.W., Tian, X.L., Hou, C.Q., 2007. Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod *Nitocra* sp. *Journal of Invertebrate Pathology* 97, 33–39.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999. 757 p.
- ANDREATTA, E.R.; BELTRAME, E. Cultivo de camarões marinhos. In: POLI, C.R. et al. (Eds.) **Aqüicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, 2004. p. 199-220.
- APHIS-USDA. White Spot Disease in Brazil - Impact Worksheet. January 27, 2005. APHIS-USDA, Natural Resources Research: Fort Collins, CO Center. 2005. Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cei/tafiw_2005_files/foreign/whitespot_brazil_012705_files/WhitespotdiseaseBrazil012105.htm. Acesso em: 16 agosto 2008.
- AUSUBEL, F.M. et al. (Eds.). **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: Greene Publishing Associates, 2003.
- BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, v. 191, p. 3-11, 2000.
- BONDAD-REANTASO, M.G. et al. **Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases**. Fao Fisheries Technical Paper, FAO, Rome. 2001. p. 178-182.
- BORGHETTI, N.R.B; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. **Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 2003. 128p.
- CAMARGO, S.G.O.; POUHEY, J.L.O. Aqüicultura - Um Mercado em Expansão. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 393-396, out./dez., 2005.
- CANE, P.A. et al. Use of real time PCR and fluorimetry to detect lamivudine resistance-associated mutations in hepatitis B virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1600– 1608, 1999.
- CHANG, P.S. et al. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 131-139, 1996.
- CHAPMAN, R.W. et al. Sampling and evaluation of white spot syndrome virus in commercially important Atlantic penaeid shrimp stocks. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 59, p. 179–185, 2004.
- CHAYABURAKUL, K. et al. Different responses to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus monodon* and *P. vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 67, p. 191–200, 2005.
- CHOU, H.Y. et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, p. 165–173, 1995.
- COSTA, S.W.; ANDREATTA, E.R.; GRUMANN, A. **Programa Estadual para o Desenvolvimento do Cultivo de Camarões Marinhos**. Secretaria de Desenvolvimento Rural e Agricultura/Epagri. 37p. 1999.
- DEGEN, H.J. et al. (Eds.). **PCR Applications Manual**. 3. ed. Germany: Roche Diagnostics GmbH, 2006. 338 p.
- DIEU, B.T.M. et al. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 3607–3618, 2004.
- DURAND, S. et al. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 59–66, 1996.

DURAND, S. et al. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 29, n. 3, p. 205-211, 1997.

DURAND, S.V.; LIGHTNER, D.V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 381–389, 2002.

DURAND, S.V. et al. Qualitative and quantitative studies on the relative virus load of tails and heads of shrimp acutely infected with WSSV. **Aquaculture**, v. 216, p. 9–18. 2003.

EISEL, D.; GRÜNEWALD-JANHO, S.; KRUCHEN, B. (Eds.). **DIG Application Manual for Nonradioactive *in situ* hybridization**. 3. ed. Penzberg: Roche Diagnostics GmbH, 2002. 242 p.

ESCOBEDO-BONILLA, C.M. et al. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 1–18, 2008.

FLEGEL, T.W. Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 13: p. 433–442, 1997.

GARZA, J.R. et al. Demonstration of infectious Taura Syndrome virus in the feces of sea gulls collected during an epizootic in Texas. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 9, n. 2, p. 156-159, 1997.

HOSSAIN, S. et al. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using *nested* polymerase chain reaction. **Aquaculture**, v. 198, p. 1–11, 2001.

INOUYE, K. et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. **Fish Pathology**, v. 29, p. 149–158, 1994.

INOUYE, K. et al. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia. **Fish Pathology**, v. 31, p. 39–45, 1996.

KARUNASAGAR, I.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. **Aquaculture**, v. 153, p. 9–13, 1997.

KASORNCHANDRA, J.; BOONYARATPALIN, S.; ITAMI, T. Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: microscopic observation and polymerase chain reaction. **Aquaculture**, v. 164, p. 243–251, 1998.

KIATPATHOMCHAI, W. et al. A non-stop, single-tube, semi-*nested* PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 47, p. 235–239, 2001

KIM C.K. et al. Development of a polymerase chain reaction (PCR) procedure for the detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp. **Journal of Fish Diseases**, v. 21, p. 11-17, 1998.

KOU, G.H. et al. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. In: FLEGEL, T.W. (Ed.). **Advances in Shrimp Biotechnology**. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 1998. p. 267–271.

LEWIN S.R. et al. Use of real time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. **Journal of Virology**, v. 73, p. 6099–6103, 1999.

LIGHTNER, D.V. **A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp**. World Aquaculture Society, Los Angeles: Baton Rouge, 1996. 304 p.

- LIGHTNER, D.V. et al. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. **Scientific and Technical Review, Office of International Epizootics**, v. 16, n. 1, p. 146-160, 1997.
- LIGHTNER D.V. et al. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 10, p. 271–281, 1998.
- LO, C.F. et al. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 25, p. 133–141, 1996a.
- LO, C.F. et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 215–225, 1996b.
- LOTZ, J.M.; SOTO, A.M. Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 50, p. 199–209, 2002.
- LU, C.C. et al. Development of a *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) DNA probe by polymerase chain reaction and sequence analysis. **Journal of Fish Diseases**, v. 16, p. 551–559, 1993.
- MAGBANUA, F.O. et al. White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 42, p. 77–82, 2000.
- MAZID, M.A.; BANU, A.N.H. An overview of the social and economic impact and management of fish and shrimp disease in Bangladesh, with an emphasis on small-scale aquaculture. In: ARTHUR, J.R. et al. (Eds.) **Primary Aquatic Animal Health Care in Rural, Small-Scale Aquaculture Development**. Rome: FAO Fisheries Technical Paper 406, 2002. p. 21–25. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/005/Y3610E/y3610E00.HTM>>. Acesso em: 03 novembro 2008.
- MELLO, G.L; FARIAS, A.P. Policultivo de tilápias e camarões marinhos – Os resultados das primeiras experiências em Laguna – SC. **Panorama da Aqüicultura**, Botafogo, v. 17, n. 102, p. 42-47, jul./ago., 2007.
- MISCIATTELLI, N.; JONES, D.A.; LATCHFORD, J.W. Potencial of several different methods of combating bacterial disease in shrimp aquaculture with special emphasis on quorum sensing. In: **V Congresso Ecuatoriano de Acuicultura**, 1999, Guayaquil, Ecuador.
- MOUILLESSEAUX, K.P.; KLIMPEL, K.R.; DHAR, A.K. Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicon size in SYBR Green real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 111, p. 121-127, 2003.
- MULLIS, K.B.; FALLONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**. v. 155, p. 335-351, 1987.
- NADALA, E.C.B.; LOH, P.C. A comparative study of three different isolates of white spot virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 33, p. 231–234, 1998.
- NATIVIDAD, K.D.T.; NOMURA, N.; MATSUMURA, M. Detection of White spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step *nested* PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 28–34, 2008.
- NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real: Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, jul./dez. 2004. Disponível em: <<http://www.dbc.uem.br/docentes/cida/s2-cida.pdf>>
- NUNAN, L.M.; LIGHTNER, D.V. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). **Journal of Virological Methods**, v. 63, p. 193–201, 1997.

NUNAN, L.M.; POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V. The detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Yellow Head Virus (YHV) in imported commodity shrimp. **Aquaculture**, v. 160, p. 19–30, 1998a.

NUNAN, L.M.; POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura syndrome virus (TSV) in experimentally infected shrimp. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 34, p. 87–91, 1998b.

NUNAN, L.M.; POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V. Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. **Marine Biotechnology**, v. 2, p. 319–328, 2000.

OIE - World organisation for animal health. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. Part 4. 2003. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/en_index.htm>. Acesso em: 24 julho 2006.

OTTA, S.K. et al. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 38, p. 67–70, 1999.

PÁEZ-OSUNA, F. The environmental impact of shrimp aquaculture: a global perspective. **Environmental Pollution**, v. 112, p. 229-231, 2001.

PARK, J.H. et al. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 34, p. 71–75, 1998.

PÉREZ, F.; VOLCKAERT, F.A.M.; CALDERÓN, J. Pathogenicity of white spot syndrome virus on postlarvae and juveniles of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture**, v. 250, p. 586-591, 2005.

PHROMJAI, J. et al. Detection of hepatopancreatic parvovirus in Thai shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 51, p. 227–232, 2002.

RAJAN, P.R. et al. White spot baculovirus syndrome in the Indian shrimp *Penaeus monodon* and *P. indicus*. **Aquaculture**, v. 184, p. 31–44, 2000.

RAJENDRAN, K.V. et al. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crayfish and lobsters from India. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 183–191, 1999.

ROCHA, I.P. **A Indústria Brasileira do Camarão Cultivado**. 2002. Disponível em: <<http://www.mcraquacultura.com.br/publicacoes.php>>. Acesso em: 29 setembro 2005.

ROCHA, I.P. **A Indústria Brasileira do Camarão Cultivado**. Palestra apresentada no Seminário Internacional Sobre a Indústria do Camarão Cultivado, WAS'2003, 19 – 23 de Maio, Salvador – BA. Disponível em: <<http://www.mcraquacultura.com.br/arquivos/A%20Industria%20Brasileira%20Camarao%20Cultivado.pdf>>. Acesso em: 09 novembro 2008.

ROCHA, I.P. Panorama da carcinicultura brasileira em 2007. **Panorama da Aqüicultura**, Botafogo, v. 104, p. 26-31. nov./dez., 2007.

ROSENBERRY, B. World shrimp farming 2000. In: ROSENBERRY, B. (Ed.) **Shrimp News International**. San Diego: Shrimp News International, 2001. 324 p.

ROUT, N. Transcriptional and translational expression profile of a white spot syndrome viral (WSSV) gene in different organs of infected shrimp. **Aquaculture**, v. 245, p. 31– 38, 2005.

SAHUL-HAMEED, A.S. et al. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. **Aquaculture**, v. 160, p. 31–45, 1998.

SHEKHAR, M.S.; AZAD, I.S.; RAVICHANDRAN, P. Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 261, p. 1122–1127, 2006.

SILVA-VALENZUELA, M.G. et al. Hibridização *in situ* com sonda não-radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 207-213, 2006.

SUBASINGHE, R.P. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 67, p. 117–124, 2005.

TAKAHASHI, Y. et al. Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans lipopolysaccharide* (LPS). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 10, p. 555–558, 2000.

TANG, K.F.J.; LIGHTNER, D.V. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 44, p. 79–85, 2001.

TAPAY, L.; NADALA, C.; LOH, P. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus. **Journal of Virological Methods**, v. 82, p. 39-43, 1999.

VENEGAS, C.A. et al. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 42, p. 83–89, 2000.

WANG, C.H. et al. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, p. 239–242, 1995.

WANG, C.H. et al. Nested polymerase chain reaction and *in situ* hybridization for detection of nucleopolyhedrosis. **Journal of Virological Methods**, v. 84, p. 65–75, 2000.

WANG, Q. et al. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v. 170, p. 179-194, 1999.

WANG, Q., POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. **Archives of Virology**, v. 145, p. 263–274, 2000a.

WANG, Q.; NUNAN, L.M.; LIGHTNER, D.V. Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and southern blot hybridization. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 43, p. 175–181, 2000b.

WANG, X.; ZHAN, W. Development of an immunochromatographic test to detect White Spot Syndrome Virus of shrimp. **Aquaculture**, v. 255. p. 196-200, 2006.

WANG, Y.C. et al. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. **Aquaculture**, v. 164. p. 221–231, 1998.

WANG, Y.G. et al. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 39, p. 1–11, 1999.

WONGTEERASUPAYA, C. et al. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 21, p. 69–77, 1995.

WONGTEERASUPAYA, C. et al. DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNoBII gives positive *in situ* hybridization with white spot viral infection in six penaeid shrimp species. **Aquaculture**, v. 143, p. 23–32, 1996.

WU, J.L. et al. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 47, p. 129–135, 2001.

ZHAN, W.B. et al. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 10, p. 405–410, 1998.